U N I V E R S I T A R I
S E R I A B I O L O G I

Dorina Cachiță-Cosma, Constantin Deliu
Lenuța Rakosy-Tican, Aurel Ardelean

TRATAT DE BIOTEHNOLOGIE VEGETALĂ

VOL.1

11.974

BIBL. CENTR. UNIV.
M. „EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE
III - 11.974

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dorina Cachiță-Cosma
Lenuța Rakosy-Tican
Constantin Deliu
Aurel Ardelean

TRATAT DE BIOTEHNOLOGIE VEGETALĂ

Vol. 1

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Colecţia **UNIVERSITARIA**
Seria ***Biologia***

Coperta: **Emanuel Hărdăuţ**

Referenţi ştiinţifici:
Prof. univ. dr. SORAN VIOREL, membru de onoare al Academiei Maghiare de Ştiinţe din Budapesta (Ungaria)
Prof. univ. dr. CRĂCIUN CONSTANTIN, Universitatea „Babeş-Bolyai" Cluj-Napoca, Facultatea de Biologie şi Geologie; Directorul Centrului de Microscopie Electronică

Coordonatorul volumului:
Prof. univ. dr. CACHIŢĂ-COSMA DORINA

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României
Tratat de biotehnologie vegetală / Dorina Cachiţă-Cosma, Constantin Deliu, Lenuţa Rakosy-Tican, Aurel Ardelean. Cluj-Napoca: Dacia, 2004
vol.
ISBN 973-35-1798-4
Vol. 1. - 2004. - ISBN 973-35-1799-2

I. Cachiţă-Cosma, Dorina
II. Deliu, Constantin
III. Rakosy-Tican, Lenuţa
IV. Ardelean, Aurel

57:62

© **Editura Dacia**
Cluj-Napoca: 3400, Calea Dorobanţilor nr. 3 et. IV
tel. 0264/45 21 78, O.P. 1, C.P. 160
e-mail: edituradacia@hotmail.com, www.edituradacia.ro
Bucureşti: Oficiul poştal 15, sector 6
str. General Medic Emanoil Severin nr. 14
tel. 021/315 89 84, fax: 021/315 89 85
Satu Mare: 3600, B-dul Lalelei R13 et. VI ap. 18
tel. 0261/76 91 11; fax: 0261/76 91 12
Căsuţa poştală 509; Piaţa 25 octombrie nr. 12
www.multiarea.ro
Baia Mare: 4800, str. Victoriei nr. 146
tel./fax: 0262/21 89 23
Târgu Mureş: 4300, str. Măgurei nr. 34
tel./fax: 0265/13 22 87

Tehnoredactare computerizată: ing. Cachiţă Victor

Comanda nr. 5103

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Domnului
Acad. Prof. dr. C. Toma,
cu deosebită considerație
9 iunie 2004

Dorina Cachiță-Cosma
Lenuța Rakosy-Tican

Constantin Deliu
Aurel Ardelean

TRATAT DE BIOTEHNOLOGIE VEGETALĂ

VOL. I

311866
B.C.U. IASI

EDITURA DACIA
Cluj-Napoca

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

arădo
B.C.U. „M. EMINESCU" I-ŞI
BIOLOGIE
08 DEC 2006

- ***Prof.univ.dr. Dorina Cachiță-Cosma***
  -Universitatea din Oradea
  Facultatea de Ştiinţe
  Catedra Biologie
  - Profesor asociat la Universitatea de Vest "Vasile Goldiş" Arad
  - Preşedinte al Asociaţiei Române de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale

- ***Cercet.şt.pr. II dr. Constantin Deliu***
  -Instiutul de Cercetări Biologice Cluj-Napoca
  Şeful laboratorului de Biologie experimentală şi Biochimie

- ***Conf.univ.dr. Lenuța Rakosy-Tican***
  -Universitatea "Babeş-Bolyai" Cluj-Napoca
  Catedra de Biologie experimentală

- ***Prof.univ.dr. Aurel Ardelean***
  -Universitatea de Vest "Vasile Goldiş" Arad
  Facultatea de Biologie
  -Profesor asociat la Universitatea din Oradea
  Facultatea de Medicină şi Farmacie

BCU IASI - NRA UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

PREFAȚĂ
1. BIOTEHNOLOGIA VEGETALĂ (**Dorina Cachiță-Cosma și Aurel Ardelean**)..5
1.1. INTRODUCERE ..5
1.2. ISTORIC ..10
1.2.1. Pe plan internațional..10
1.2.2. În România..29
2. VITROCULTURILE VEGETALE ȘI TIPUL ACESTORA. PRINCIPII DE BAZĂ (**Dorina Cachiță-Cosma**)..37
3. LABORATORUL DE BIOTEHNOLOGIE VEGETALĂ ..59
(**Dorina Cachiță-Cosma**)
3.1. INTRODUCERE ..59
3.2. AMENAJAREA UNEI UNITĂȚI DE VITROCULTURI VEGETALE ..64
3.2.1. Amenajarea zonei *nesterile* ..69
3.2.1.1. Spălătorul ..69
3.2.1.2. Încăperea cu autoclave, distilator (bidistilator) și etuve ..70
3.2.1.3. Laboratorul propriu – zis ..72
3.2.1.4. Camera de creștere ..74
3.2.1.5. Sera ..78
3.2.2. Amenajarea zonei sterile, aseptice ..80
3.2.2.1. Incinta sterilă sau camera de inoculare ..80
3.2.3. Înzestrarea laboratorului de biotehnologie vegetală ..83
3.2.3.1. Sticlăria ..83
3.2.3.2. Aparatura ..86
3.2.3.3. Instrumentarul ..86
3.2.3.4. Materiale diverse ..87
3.2.3.5. Compuși chimici ..87
3.2.3.5.1. Substanțe și alte materiale chimice ..87
3.3. ASEPSIA ȘI ASEPSIZAREA ..89
3.3.1. Sterilizarea încăperilor, a suprafețelor și a instrumentarului ..91
3.3.2. Sterilizarea recipientelor de cultură și dezinfectarea altor obiecte ..93
3.3.3. Sterilizarea lichidelor, a apei și a mediilor de cultură ..95
3.3.4. Asepsizarea materialului vegetal ..99
3.4. MEDII DE CULTURĂ ..106
3.4.1. Compușii utilizați în prepararea mediilor de cultură destinate vitroculturilor vegetale ..108
3.4.1.1. Compușii anorganici ..108
3.4.1.1.1. *Apa* ..108
3.4.1.1.2. *Sărurile anorganice* ..111
3.4.1.2. Compușii organici ..119
3.4.1.2.1. Surse de carbon organic ..120
3.4.1.2.2. Surse de azot organic ..122
3.4.1.2.3. Vitaminele ..123
3.4.1.2.4. Fitohormonii, regulatorii de creștere sau fitoregulatorii ..124
a. *Auxinele* ..128
b. *Citochininele* ..133

BCU IASI - UNIVERSITY LIBRARY

c. *Giberelinele* 138
d. *Etilena* 140
e. *Acidul abscisic şi alţi inhibitori* 147
3.4.1.2.5. Compuşii fenolici 148
3.4.1.2.6. Alte substanţe cu efecte în reglarea creşterii vitroculturilor vegetale 150
Amestecuri complexe şi extracte vegetale 151
3.4.1.2.7. Agenţi gelificanţi 151
3.4.1.2.8. Compuşi speciali 152
Compuşi antivirali 153
Cărbunele activ (cărbunele de lemn) 153
3.4.1.3. Recomandări generale 154
3.5. CORMOFITOINOCULII – PARAMETRI TEHNICI ŞI BIOLOGICI. PRINCIPII DE BAZĂ 155
3.5.1. Consideraţii generale 155
3.5.2. Selectarea materialului vegetal pentru vitrocultură 160
3.5.2.1. Criterii urmărite în momentul *înfiinţării* unei vitroculturi aseptice primare sau a *iniţierii* unui alt tip de cultură *in vitro* 160
3.5.2.2. Caracteristici *morfofiziologice* ale viitorilor cormofitoinoculi 171
3.5.3. Inocularea, incubarea, creşterea dirijată a culturilor, subcultivarea sau repicarea 184
3.5.4. Vitroconservarea 192
3.6. TRANSFERAREA VITROPLANTULELOR *EX VITRO* ŞI ACLIMATIZAREA LOR LA MEDIUL SEPTIC DE VIAŢĂ 196
4. CALUSUL ŞI CULTURA DE CALUS 208
BIBLIOGRAFIA capitolelor 1 - 4 228
5. CULTURILE DE CELULE LA CORMOFITE 246
(Constantin Deliu)
5.1. INTRODUCERE 246
5.2. CULTURILE DE CELULE VEGETALE SCURT ISTORIC 247
5.3. INTRODUCERE ÎN TEHNICA ŞI TEHNOLOGIA CULTURILOR DE ŢESUTURI ŞI CELULE VEGETALE 249
5.3.1. Terminologia utilizată în domeniul culturilor de ţesuturi şi celule vegetale 249
5.4. TEHNICA CULTURILOR DE CALUS ŞI A SUSPENSIILOR CELULARE VEGETALE 251
5.4.1. Importanţa asepsiei 251
5.4.2. Testarea asepsiei culturilor celulare 251
5.4.3. Condiţiile necesare pentru inducerea culturilor de calus şi a suspensiilor celulare 253
5.4.3.1. Alegerea şi prepararea explantelor 253
5.4.3.2. Stabilirea compoziţiei mediului de cultură 255
5.4.4. Iniţierea culturilor de calus şi a suspensiilor celulare 258
5.4.4.1. Calusul 258
5.4.4.2. Suspensiile celulare 260
5.4.5. Caracteristicile culturilor calusale şi ale suspensiilor celulare 267
5.4.5.1. Creşterea şi dezvoltarea calusului 267

5.4.5.2. Heterogenitatea calusului şi a suspensiilor celulare 268
5.4.5.2.1. *Heterogenitatea calusului* 268
5.4.5.2.2. *Heterogenitatea suspensiilor celulare* 269
5.4.5.3. Variabilitatea culturilor celulare vegetale 272
5.4.6. Metode de evaluare a creşterii culturilor de celule 275
5.4.6.1. Determinarea cantitativă a creşterii celulare 275
5.4.7. Factorii care influenţează creşterea culturilor de calus şi a celor de suspensii celulare 283
5.4.7.1. Presiunea osmotică a mediului nutritiv 283
5.4.7.2. Nutrienţii 285
5.4.7.2.1. *Nutrienţii anorganici* 286
5.4.7.2.2. *Nutrienţii organici* 291
5.4.7.2.3. *Alţi factori* 294
5.5. SISTEME DE CULTIVARE A SUSPENSIILOR CELULARE VEGETALE 296
5.5.1. Creşterea celulelor în sistemul închis – cultura de tip "batch" 298
5.5.1.1. Absorbţia nutrienţilor 300
5.5.1.2. Modificările morfofiziologice care apar pe durata ciclului de creştere 304
5.5.1.3. Durata ciclului celular 313
5.5.2. Creşterea celulelor în sisteme deschise 315
5.5.2.1. Chemostatul 315
5.5.2.2. Turbidostatul 322
5.5.2.3. Sistemul de cultură continuu, fazat (sau sincron) 323
5.6. CULTIVAREA PE SCARĂ LARGĂ A CELULELOR VEGETALE 324
5.6.1. Tipuri de bioreactoare 325
5.6.2. Factori care pot influenţa cultivarea pe scară largă a celulelor vegetale 332
5.6.2.1. Mixarea 332
5.6.2.2. Aerarea 336
5.6.2.3. Spumarea şi adeziunea de suprafaţă a celulelor vegetale 337
5.6.2.4. Alţi parametri de cultură 338
5.7. IMOBILIZAREA CELULELOR VEGETALE CULTIVATE *IN VITRO* SUB FORMĂ DE SUSPENSII 339
5.7.1. Scopul imobilizării celulelor cormofitelor şi aplicaţiile practice ale acestei tehnici 340
5.7.2. Avantajele imobilizării celulelor cormofitelor 342
5.7.3. Metode de imobilizare 343
5.7.3.1. Imobilizarea celulelor vegetale prin legarea lor de un suport solid – adsorbţia 343
5.7.3.2. Fixarea între membrane artificiale 344
5.7.3.3. Includerea celulelor vegetale în geluri 344
5.7.3.4. Includerea celulelor în structuri preformate 346
5.7.4. Efectele imobilizării asupra proprietăţilor celulelor vegetale 348
5.7.4.1. Metabolismul primar 348
5.7.4.2. Metabolismul secundar 348

5.8. PERSPECTIVELE CULTURILOR DE CELULE VEGETALE INDUSE DIN CORMOFITE 350
BIBLIOGRAFIE 351
6. IZOLAREA ŞI CULTURA PROTOPLASTELOR VEGETALE 362
(Lenuţa Rakosy-Tican)
6.1. INTRODUCERE 362
6.2. IZOLAREA PROTOPLASTELOR VEGETALE 364
6.3. IZOLAREA SUBPROTOPLASTELOR VEGETALE 379
6.4. CULTURA DE PROTOPLASTE VEGETALE 381
6.5. REGENERAREA PLANTELOR DIN PROTOPLASTE 392
6.6. METODE DE STIMULARE A CAPACITĂŢII MORFOGENETICE A PROTOPLASTELOR 393
6.7. CRIOSTOCAREA PROTOPLASTELOR 395
6.8. METODE DE IZOLARE ŞI DE CULTURĂ A PROTOPLASTELOR VEGETALE – EXEMPLE 396
6.8.1. Izolarea, cultura şi regenerarea de plante din protoplaste mezofiliene, la soiuri diploide şi tetraploide de cartof (*Solanum tuberosum* L.) 396
6.8.2. Izolarea, cultura şi regenerarea plantelor din protoplaste izolate din suspensii celulare de *Nicotiana africana* Merxm 404
6.8.3. Izolarea, cultura şi regenerarea de plante din protoplaste de hipocotil, la floarea soarelui 408
BIBLIOGRAFIE 414
GLOSAR DE TERMENI UTILIZAŢI ÎN BIOTEHNOLOGIE
(Dorina Cachiţă-Cosma) 423

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAȚĂ

Prezentul **"Tratat de biotehnologie vegetală"** este dedicat împlinirii a *100* de ani de la publicarea de către ilustrul botanist german *Haberlandt* (în anul 1902) a ipotezei *totipotențialității celulei vegetale*, punct de vedere potrivit căruia este posibilă cultivarea celulelor plantelor, explantate fiind din organismul cărora le-au aparținut.

În decursul celor 100 de ani care au trecut de la acest eveniment istoric, *vitroculturile* – chiar și cele vegetale – s-au perfecționat și au generat noi ramuri în domeniul biologiei moderne, luând naștere *biotehnologia*, disciplină dinamică, care s-a impus în contextul contemporan, prin surprinzătoare și eficiente aplicații industriale și economice.

Progresele realizate în secolul XX în domeniul cercetărilor fundamentale, precum și importantele descoperiri înregistrate în tehnica și informatica modernă, au deschis biotehnologiilor - încă de la începutul secolului trecut - perspective largi și nebănuite, cu implicații socio-economice majore.

Aplicațiile practice ale vitroculturilor vegetale au revoluționat practicile *agricole*, *silvice*, *fitofarmaceutice*, precum și cele de *ameliorare* și *genetică vegetală*, de *morfologie* și de *fitofiziologie experimentală*, elaborându-se și asimilându-se, în *vitroindustrii*, tehnici de clonare și de micropropagare rapidă a plantelor, ori noi proceduri de valorificare în industrie a biomasei produse prin *vitrocultură*.

Secolul XX s-a dovedit a fi deosebit de fertil și în ceea ce privește progresele realizate în domeniul *ingineriei genetice*.

Majoritatea studiilor efectuate timp de un secol în domeniul vitroculturilor vegetale au servit la elucidarea mai multor aspecte privind regenerarea, creșterea, morfo- și organogeneza, embriogeneza somatică, *autonomia* morfofiziologică a unor structuri tisulare sau a unor tipuri celulare, în funcție de compoziția mediilor de cultură și a condițiilor ecofiziologice din recipientele de cultură și din camerele de creștere. Există însă, încă, numeroase necunoscute cu privire la unii factori implicați în morfogeneză (la nivel celular și molecular), precum și referitor la transmiterea și exprimarea informației genetice dobândite din afara genomului propriu.

În literatura de specialitate abundă, zi de zi, noi informații referitoare la rezultatele cercetărilor efectuate în domeniul vitroculturilor vegetale. Astfel, prin permanenta îmbogățire și aprofundare a cunoștințelor de biologie celulară și a celor de biologie moleculară, precum și a celor de genetică, a mecanismelor eredității și a căilor de modificare țintită a genomului unei celule sau ale unui organism, se creează posibilitatea lansării unor noi studii referitoare la modelarea calităților și a caracterelor unor ființe vii, de o așa manieră încât vieţuitoarele rezultate în urma unor operațiunilor de inginerie genetică, respectiv genică, să corespundă într-o măsură din ce în ce mai mare unor scopuri practice urmărite de experimentatori. În acest mod, treptat, biologia aplicată a devenit o "forță de producție", în economia mondială modernă, tinzându-se în direcția obținerii de plante mai bine adaptate condițiilor de mediu, cultivari sau genotipuri care să constituie – pentru om și animale – *noi surse de hrană ori de materii prime*, sau plante, care să dețină calități deosebite din punct de vedere biologic sau bioproductiv.

Biotehnologia vegetală face parte integrantă din "mișcarea de renaștere" a biologiei contemporane, în principal prin revoluția produsă de progresele realizate în cercetările cu profil **biotehnologic**, ea constituindu-se în ceea ce a primit denumirea

generică de "*revoluția verde*", fenomen care se poate spune că s-a născut și grație descoperirilor lui *Morel* și *Martin* (1952), care – în urmă cu cinci decenii – au realizat tehnic, la dalii, și ulterior la cartof (1955), *eradicarea virozelor* prin și în *vitrocultură*, utilizând ca inoculi inițiali meristeme caulinare, apicale, prelevate de la plante mame polivirusate. Deci, anul 2002 a fost, marcat nu numai de *centenarul* lansării explicite a ipotezei lui *Haberlandt*, cu privire la posibilitatea cultivării în regim autonom a celulelor vegetale, ci și de *semicentenarul* realizării practice a vitroculturilor vegetale eradicate de agenți patogeni, în special de viroze, cu micropropagarea acestor plante "in vitro". Revoluția privește, însă, și multiple implicații ale vitroculturilor de celule și de țesuturi cormofitice în alte domenii ale producției materiale, înțelegând prin aceasta valorificarea *biomasei* rezultate din culturile de celule, de calus, de rădăcini, de lăstari sau de embrioni somatici, în fitoreactoare, ca materie primă în industria fitofarmaceutică sau în cea alimentară (coloranți, arome, pureuri etc.), ori – în funcție de modul în care este organizată și condusă vitrocultura – culturile de celule servesc la *bioconversia* sau la *biotransformarea* unor compuși organici, precursori în prepararea ori în transformarea unor produși *secundari de metabolism*. Culturile de celule, pe de altă parte, sunt utile – prin intermediul embrionilor somatici – și la producerea de *semințe artificiale*.

Dovedirea omnipotențialității celulelor vegetale, prin *vitrocultură*, se află în continuă extindere, cunoștințele referitoare la totipotențialitatea acestora lărgindu-se pe măsura adâncirii cercetărilor și a progreselor științifice și tehnice realizate în acest domeniu, sau în domeniile tangente biologiei, în permanență existând posibilitatea deschiderii a noi direcții de investigație, pe măsura succeselor obținute în modificarea țintită a genomului celular, prin aplicarea de diferite proceduri de inginerie genetică.

Culturile *in vitro* de variate tipuri de explante, respectiv de *protoplaști*, *celule*, *calusuri*, *organe*, *țesuturi*, *embrioni*, *protocormi*, *propaguli*, *stoloni* etc., servesc și ca *obiect de studiu* sau chiar ca "instrument" de cercetare, în variatele ramuri ale biologiei vegetale, în investigații de fitofiziologie și de morfologie vegetală, experimentală, în cele referitoare la regenerare, de diferențiere, histogeneză, diferențiere, organogeneză, embriogeneză, multiplicare și creștere celulară, în cele de morfogeneză genetică și ameliorare, precum și în cercetările legate de micropropagare, de sinteză a produșilor secundari de metabolism, în dependență de condițiile de mediu și altele.

"**Tratatul de biotehnologie vegetală**" se dorește a fi o lucrare monografică de sinteză, editată în mai multe volume, care prezintă principalele aspecte referitoare la biotehnologia vegetală modernă, obiectele ei de studiu și aplicațiile practice ce derivă din cultivarea "in vitro" a variatelor categorii de *cormofitoinoculi*.

Monografia se adresează atât specialiștilor din domeniul culturilor de țesuturi și de celule vegetale, cât și celor care doresc să se informeze despre ultimele cuceriri științifice dobândite în această nouă ramură a biologiei vegetale, celor ce vor să cunoască cele mai recente cercetări referitoare la *cormofitovitroculturi*. Tratatul se adresează și doctoranzilor, masteranzilor sau studenților din profile teoretice și aplicative ale biologiei plantelor.

Aducem mulțumirile noastre Universității de Vest "Vasile Goldiș", din Arad, pentru sprijinul acordat în publicarea acestui tratat, primul de acest gen din literatura noastră națională.

Prof. univ. dr.
Dorina Cachiță-Cosma

BCU

1. BIOTEHNOLOGIA VEGETALĂ

1.1. INTRODUCERE

Perfecționarea continuă, secol de secol, deceniu de deceniu, an de an și zi de zi, a aparaturii utilizate în cercetare, precum și a tehnicilor de lucru, concomitent cu creșterea vitezei de circulație a informației și a comunicării între specialiști, a popularizării noilor cuceriri științifice și tehnice, a condus la realizarea unor progrese din ce în ce mai mari și mai rapide, în toate domeniile de activitate, permițând dezvoltarea – mai ales în zilele noastre – a unor noi ramuri teoretice și practice importante, cu precădere în *biologie*.

Spiritul analitic al omului modern a înlocuit simțul descriptiv și contemplativ al omului din antichitate, sau a celui din epoca medievală, cu *acțiunea*, curiozitatea împingându-l pe acesta nu numai înspre analizarea obiectelor și a ființelor ce-l înconjoară (observând comporatamentul viețuitoarelor), a naturii și a fenomenelor naturale, ci și spre dezmembrarea sau asamblarea diferitele corpuri din preajma sa, încercând, prin aceasta, să le descopere calitățile. Astfel, el și-a îmbogățit cunoștințele dobândite, valorificându-le în beneficiul său, sau în cel social. *Observația*, *experimentul*, *deducția* și *comparația* i-au servit acestuia la valorificarea continuă, pe un plan superior, a cunoștințelor acumulate, concluziile la care el a ajuns – în urma nenumăratelor experimente întreprinse – ajutându-l să deceleze generalul de particular, respectiv să desprindă ceea ce este specific, de ceea ce este comun. Ulterior, acumularea de cunoștințe a necesitat sistematizarea și coroborarea acestora. Spiritul analitic al omului i-a permis acestuia intuirea interrelațiilor existente între fenomenele biologice care se află la baza proceselor fiziologice sau la temelia unor morfostructuri. Firea iscoditoare a omului l-a ajutat pe acesta să-și imagineze noi experimente, speculând cunoștințele dobândite și deducând corelații posibile, idei care au devenit *ipoteze* de lucru, ce s-au cerut verificate prin noi experimente care – odată cu trecerea timpului – au infirmat sau au confirmat supozițiile ce au stat la baza acțiunilor sale, împingându-se astfel granițele cunoașterii spre alte limite.

Încă din primele momente ale înființării cunoștințelor despre natură, omul a înțeles că perpetuarea speciilor și *biodiversitatea* sunt asigurate prin *reproducere*, una din însușirile fundamentale ale ființelor vii. Prin reproducere se realizează nu numai o propagare a speciilor, pe arii tot mai extinse, ci și o continuitate a lor în timp, transmițându-se descendenților informațiile

genetice deținute, respectiv acumulate în fiecare organism, de-a lungul dezvoltării lui *ontogenetice*, potrivit evoluției sale *filogenetice*. Organismele care iau naștere prin *reproducerea sexuată* nu dețin integral informația ereditară a părinților (rezultată printr-o combinare a caracterelor pe care le-au posedat cei doi părinți), *reproducerea* fiind generarea de descendenți prin intermediul *înmulțirii sexuate*, ca modalitate superioară de *propagare*, caracterizată prin nașterea fiecărui urmaș din câte o unică celulă *mixtă* – *zigotul* – derivată din contopirea, în urma procesului de fecundație, a două celule reproducătoare, de sex opus, denumite *gameți* (celule *haploide* care au în antecedență diviziunea *reducțională*, *meiotică*, a celulelor mame ale celulelor gametice – gametocite); deci, prin contopirea gameților, a *spermatiei* cu *oosfera*, rezultă celula *ou* sau *zigot*, celulă germinativă, *diploidă*, capabilă – prin diviziuni repetate – să dea naștere *embrionului zigotic*. Acesta, postgerminație, generează un nou organism, asemănător dar *nu* identic cu cel al părinților, foști parteneri în procesul de fecundație. Spre deosebire de înmulțirea sexuată, înmulțirea *asexuată* a plantelor (denumită și înmulțire de tip *vegetativ* sau *parasexuat*) constă în mărirea numărului de exemplare dintr-un individ, clonat pe cale *regenerativă*, având ca punct de plecare porțiuni care provin dintr-o unică plantă, numită plantă *mamă* (descendenții rezultați prin regenerare fiind lipsiți de "tată"), în final, prin înmulțirea vegetativă obținându-se tot atâtea copii – identice cu genotipul supus regenerării – câte fragmente au stat la baza *clonării*, în vitrocultură, *clona* (după *Pierik*, 1984) fiind definită ca "*un grup de plante, țesuturi sau celule, genetic indentice, descendente – pe cale vegetativă ori apomictică – dintr-un unic organism*".

Perfecționarea continuă a tehnicilor de înmulțire vegetativă, cu înregistrarea de reușite depline în clonarea cât mai rapidă a exemplarelor celor mai valoroase, a determinat biologii – încă de la finele secolului XIX – să viseze la propagarea plantelor prin utilizarea ca material inițial a unor fragmente vegetale din ce în ce mai mici. Astfel, treptat, s-a ajuns la imaginarea și transpunerea în practică a unor tehnici de înmulțire a plantelor superioare având ca punct de plecare, în procesele regenerative, explante minuscule, chiar și numai celule solitare, aflate în vitrocultură. Pentru transpunerea în fapt a unui astfel de demers au fost necesare proceduri speciale de *vitrocultură*.

Realizarea culturilor *in vitro*, la plantele superioare, a constituit o preocupare a multor specialiști, biologi vegetali, agronomi și silvicultori, cercetări care au marcat – chiar din primii ani – întregul secol XX, studiile din acest domeniu fiind cuprinse în sintagma "*culturi de țesuturi și celule vegetale*". Pe măsură ce cercetările cu acest profil s-au extins, domeniului i

s-a consacrat denumirea de *biotehnologie vegetală*, terminologie căreia i se circumscriu toate categoriile de culturi efectuate în regim aseptic, practicate cu explante prelevate de la *plantele superioare* (*cormofitoinoculi*), respectiv culturile de *embrioni*, *organe*, *țesuturi*, *celule* sau *protoplaşti*, variatele tipuri de vitroculturi reprezentând o extindere a capacității plantelor de a se *înmulți asexuat*, pe cale vegetativă, din fragmente sau celule detaşate din *corm*, şi care, în condiții optime de mediu, pot *regenera* o nouă plantă.

Vitroculturile vegetale, în sens restrâns, privesc *inocularea* şi *creşterea* în regim steril, pe medii aseptice complexe, a unor explante macroscopice (*inoculi*), organe, țesuturi, celule ori protoplaşti, ce provin (sunt originari) din *plante superioare*, proceduri care pot fi denumite ca fiind **cormofitotehnologii**, termen ce delimitează acest tip de vitrocultură, de tehnicile de cultivare "in vitro" a microorganismelor (bacterii, alge, mucegaiuri sau ciuperci), ori de biotehnologii practicate cu inoculi constând din celule şi țesuturi animale sau umane.

Capacitatea de *înmulțire vegetativă* este o caracteristică a multor specii vegetale. Astfel, o serie de cormofite, cum sunt: cartoful, căpşunul, specii din familiile rosacee, orhidee, liliaceele, iridaceele, ranunculacee ş.a.m.d., se înmulțesc vegetativ, în mod natural (sau artificial), prin: tuberculi, bulbi, bulbili, rizomi, bulbotuberi, drajoni, ori stoloni, în timp ce marea majoritate a plantelor pot fi înmulțite vegetativ numai artificial, prin fragmente de tulpini, rădăcini sau de frunze, fragmente care pot fi: *butaşi*, *marcote*, *altoi*, *propaguli* etc. Dar, după cum a observat *Vöchting*, încă în secolul XIX, capacitatea regenerativă a butaşilor descreşte pe măsură ce scad dimensiunile fragmentelor utilizate în înmulțirea vegetativă. *Limitarea* capacității regenerative este strâns corelată cu *dimensiunea* fragmentelor utilizate ca punct de plecare în înmulțirea vegetativă şi cu *natura* acestora (din care parte a plantei provin), *sezonul* şi *fenofaza* în care s-a operat recoltarea lor, sau în care se practică înmulțirea vegetativă; legat de acestea, țesuturile şi celulele prezente în fragmentele care urmează să regenereze plante dețin un anumit grad de diferențiere a celulelor, în cadrul țesuturilor şi a organelor, în funcție de stadiul ontogenetic şi faza de dezvoltare a plantelor, respectiv a organelor, fapt care presupune existența în celulele constitutive ale acestora a unui anumit conținut endogen (ca rezerve) în nutrienți şi în fitohormoni, cantitativ şi calitativ diferiți în decursul variatelor etape ale ontogenezei; la toate acestea se mai adaugă, ca factori de influență, şi *condițiile* de *mediu*, *natura substratului* de cultură şi, nu în ultimul rând, *factorii genetici*, respectiv particularitățile de gen, *specie* şi chiar de *genotip*.

Cu toate că înmulțirea asexuată, naturală, nu este o aptitudine fiziologică caracteristică tuturor speciilor de plante, grație tehnicilor de vitro-

cultură practicate pe medii complexe, aseptice (*lichide*, *solide* sau *semilichide*), se poate realiza regenerarea de plante – având ca punct de plecare chiar şi numai o unică celulă sau un protoplast – actualmente făcând posibilă înmulţirea asexuată şi la plante la care, în mod obişnuit, propagarea vegetativă nu există.

La cormofite, *iniţierea* vitroculturilor, se face din *explante*. Prin **explant**, în sens larg (după *Pierik*, 1984), se înţelege o parte dintr-o plantă sau dintr-un *organ*, ori dintr-un *ţesut*, fragment care poate servi la iniţierea unei *vitroculturi*. Cu cât inoculul este mai mic – *celulă* sau *protoplast* – cu atât se complică situaţia şi scad şansele de reuşită în ceea ce priveşte regenerarea de plante, factorii *genetici* (*specia* şi *genotipul*), cei *fiziologici* (*endogeni*) şi cei *ecofiziologici* (*exogeni*) devenind, adeseori, factori limitativi, greu sau chiar imposibil de "armonizat" cu cerinţele unui inocul microscopic, care în regim de *autonomie morfofiziologică* trebuie să-şi menţină, în primul rând, procesele vitale şi abia apoi să-şi manifeste capacităţile regenerative. În schimb, cu cât dimensiunea inoculului (aglomerări celulare, ţesuturi, organe, embrioni, polen, sac embrionar, ovul etc.) este mai mare, cu atât cresc şansele regenerării din acesta de plante, cu un procent ridicat de reuşită şi cu o scurtare a duratei de obţinere a acestora. La nivelul vitroculturilor efectuate cu explante macroscopice, procesele de morfogeneză (organogeneză sau embriogeneză) sunt mai uşor de dirijat, consecinţele traumatice fiind mai puţin importante. Evident că, după cum se va putea vedea în cadrul diferitelor capitole din prezentul tratat, *natura* şi *originea* explantelor, *tipul* acestora, *structura* lor, *juvenilitatea* (prezenţa în explante a unor celule meristematice) ori *maturitatea* celulelor componente, sau, dimpotrivă, prezenţa în inocul a unui număr mare de celule senescente ori degenerescente, afectate *patologic* sau *fiziologic* (cum este cazul *vitrificării* sau al *hiperhidriei* ori al *habituaţiei*, fenomen echivalent cu o alterare de tip neoplazic a morfofiziologiei celulelor vegetale – vezi *Gaspar*: 1995,1998), joacă un rol major în manifestarea integrală sau parţială a capacităţii regenerative a celulelor ce alcătuiesc explantele, respectiv în exteriorizarea şi desfăşurarea completă, sau incompletă, a *totipotenţialităţii* acestora, cu generarea *in vitro* de noi şi noi celule, iniţial *nediferenţiate*, care după ce au luat naştere îşi pot exprima, sau nu, capacitatea de a se *diferenţia*, potrivit informaţiei genetice pe care o deţin în genomul lor, în final, ele generând, sau nu, vitroplantule ori calus (organogen sau embriogen), ori murind. Vitroplantulele pot fi obţinute prin *organogeneză* sau prin embriogeneză *somatică*, directă ori indirectă, respectiv din structuri organizate sau din celule, ori din calus. *Exprimarea capacităţii morfogene* depinde – într-o foarte mare măsură – de *calităţile* deţinute de celulele aflate în vitrocultură,

respectiv nu numai de prezența celulelor *meristematice*, ci și de proporția acestora în componența inoculului, sau de competența celulelor diferențiate morfofiziologic, aflate în vitrocultură, de a se dediferenția și de a *neoforma* meristeme. Capacitatea regenerativă a celulelor inoculate este, la rândul ei, dependentă de *compoziția mediului* de cultură (cu precădere de natura și concentrația regulatorilor de creștere introduși în substrat), de *conținutul endogen* în fitohormoni și în nutrienți, de *condițiile* de cultură etc. (pentru detalii vezi *Cachiță*, 1987 și *Cachiță* și *Sand*, 2000).

Din cele enumerate reiese clar faptul că problematica culturilor *in vitro* de țesuturi și celule vegetale este extrem de complexă, iar progresele din domeniul *biotehnologiei* vegetale s-au făcut resimțite și pe măsura avansării descoperirilor științifice realizate în microbiologie, în fiziologia vegetală, în citofitofiziologie, în biologia moleculară, precum și grație avansării tehnicilor de investigație din aceste domenii, dar și în biochimie, patologie, genetică (generală și vegetală), ameliorare ș.a.m.d. Particularitățile specifice vitroculturilor vegetale, cerințele și reacțiile cormofitoinoculiilor depind, într-o foarte mare măsură, nu numai de *constituția inoculului*, și de compoziția mediului de cultură, ci și de tipul de *vitrocultură*, respectiv cultură de *meristeme*, de *calus*, de *minibutași*, de *antere*, de *celule*, de *protoplaști* etc.

Explantarea organelor, țesuturilor sau a celulelor, din sistemul unitar al organismului vegetal (tânăr sau adult), și inocularea lor *in vitro*, în scopul obținerii unei *evoluții autonome*, extracorporeale, a acestora, în vitrocultură (celulele viabile inducându-și și susținându-și procesele de diviziune și de endo- și autoreglare a fenomenelor lor vitale), cu regenerarea de plantule ori de calus, de embrioni somatici sau de organe, în regim nutrițional *heterotrof*, *mixotrof* sau *fotoautotrof*, ori, dimpotrivă, cu menținerea celulelor în vitrocultură, într-o stare primară de dezvoltare (ca și culturi de celule solitare, sau imobilizate), constituie performanțe cu totul remarcabile ale biotehnologiei moderne.

Reușita cultivării *in vitro* a țesuturilor și celulelor vegetale, post-explantare, în cultura primară sau în subcultură, ridică însă, de multe ori, probleme deosebite, întrucât explantele – detașate fiind dintr-un sistem unitar, complex, unde se aflau integrate în multiple *interconexiuni* și de *interdependențe* structurale și funcționale, caracteristice unui *organism* sau *organ* viu, integru (unele organe având un rang înalt de autonomie morfofuncțională, cum ar fi cele de rezervă, în timp ce altele nu), impune ca pe parcursul vitroculturii, în recipientele de cultură să se realizeze un cadru ecofiziologic *artificial* care să permită celulelor inoculate să-și reia, în timp util, funcțiile vitale, *multiplicarea*, *creșterea* și *diferențierea* celulară, după

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

specificul culturii, procese care susțin regenerarea și evoluția vitroculturilor în sensul dorit. În caz contrar, inoculii se vor necroza la scurt timp de la amplasarea lor *in vitro*, eșuând inițierea vitroculturii sau a subculturii.

1.2. ISTORIC

1.2.1. Pe plan internațional

Cultivarea țesuturilor și a celulelor plantelor superioare, desprinse din situsul lor nativ, a constituit o incitantă problematică care a stârnit, în permanență, fantezia multor biologi, începând din ultimele decenii ale secolului XIX, mai ales ca urmare a marilor progrese științifice realizate în acea perioadă, în domeniul culturilor aseptice de microorganisme, odată cu descoperirea căilor de asepsie și de creștere pe medii artificiale a bacteriilor și a levurilor, progrese care au influențat puternic nu numai practica medicală din acele timpuri, ci și tehnicile de procesare din industria fermentativă. Aceste cercetări, în ansamblul lor, au stimulat imaginația biologilor preocupați de fiziologia celulei, celulă văzută ca o unitate vie, cu un grad ridicat de *autonomie* morfofuncțională.

Primele experiențe reușite, în ceea ce privește menținerea în viață a celulelor detașate dintr-un organism superior structurat, au fost obținute cu culturi de celule de origine animală. Astfel, *Roux* –în anul (1885) – a realizat păstrarea în viață, în soluție salină încălzită, a unui fragment neural extirpat dintr-un embrion de pasăre (după *Withers* și *Alderson*, 1986).

În primele decenii ale secolului XX, culturile de celule animale au avansat cu mai mult succes, ceea ce nu se poate afirma și despre culturile efectuate cu celule și țesuturi prelevate de la plante superioare.

Bazat pe teoria lui *Schleiden* și *Schwann* (1838-1839), care se referea la *unitatea structurală, celulară*, a organismelor vii, la autonomia și totipotența fiecărei celule, botanistul german *Haberlandt* (fig. 1), încă la sfârșitul secolului XIX, a inițiat – în laboratoarele sale din Berlin – experimente în vederea obținerii de culturi de celule vegetale, cu celule recoltate de la plante superioare, culturi practicate în scopul studierii capacității funcționale a acestora, în condițiile desprinderii lor de la situsul de origine, în ideea relevării influențelor cărora le sunt supuse celulele, atunci când ele se află integrate în structurile organismului multicelular constituit, având convingerea că fiecare celulă vie, somatică, explantată din corpul cormofitelor are capacitatea de a regenera o nouă plantă, proces asemănător celui care caracterizează potența celulei *ou* sau zigot, ipoteză și cercetări pe care *Haberlandt* le-a făcut publice în anul 1902. După *White* (1963),

Gottlieb HABERLANDT
1854 - 1945

Fig.1

Haberlandt a fost nu numai primul care a formulat explicit posibilitatea cultivării celulelor vegetale individualizate, ci a şi încercat să realizeze acest deziderat. Teoria lui *Haberlandt* s-a aflat la baza dezvoltării *biotehnologiei vegetale*, biotehnologie care a prezentat o evoluţie explozivă în cea de a doua jumătate a secolului XX, perioadă în care şi cercetările din domeniile chimiei, biochimiei, biologiei moleculare, a fizicii, a dezvoltării tehnicii, a aparaturii de laborator şi a informaticii au cunoscut, în ansamblul lor, progrese remarcabile. Este regretabil faptul că *Haberlandt*, în experimentele sale, a utilizat celule vegetale puternic *diferenţiate*, cum ar fi: ţesut palisadic (foliar), parenchim medular, celule epidermale sau variate tipuri de peri, ceea ce a cauzat eşuarea încercărilor sale de vitrocultură, efectuate timp de mai mulţi ani. De reţinut este însă faptul că, în acea perioadă existau prea puţine informaţii referitoare la nutriţia plantelor, la diferenţierea celulelor vegetale, nu erau descoperiţi încă fitohormonii şi nu erau cunoscute cerinţele ecofiziologice ale explantelor, aflate în regim de vitrocultură, în ceea ce priveşte menţinerea lor în viaţă şi susţinerea exprimării totipotenţei lor morfogene şi metabolice.

La început de secol XX, biologii inspirându-se – într-o mare măsură- din realizările obţinute cu vitroculturile practicate cu microorganisme sau cu celule şi ţesuturi animale, progresele în domeniul culturilor de explante vegetale s-au făcut lent, neînţelegându-se diferenţele de *nutriţie* dintre microorganisme şi celulele şi ţesuturile animale, per ansamblu de tip *heterotrof*, şi cele ale explantelor vegetale, cât şi în ceea ce priveşte regimul de cultură (temperatură şi iluminare), celulele fotoautotrofe sau mixotrofe ale plantelor impunând şi în vitrocultură prezenţa luminii, iar în substratul de cultură a unor săruri şi compuşi organici, alţii decât cei utilizaţi în culturile de tip heterotrof, în special a mono- sau dizaharidelor, şi nu a proteinelor.

Hanning, încă în anul 1904, a făcut experimente reușite în ceea ce privește cultivarea pe medii artificiale a unor *embrioni zigotici*, de crucifere, el fiind primul care a obținut plantule viabile, pornind de la structuri organizate, respectiv de la embrioni imaturi. Mai apoi, în anul 1922, *Kotte* (experimentând în Germania, în laboratoarele lui *Hamberlandt*) și *Robbins* (lucrând în laboratoarele Grădinii Botanice din New York) au realizat – fiecare în parte – creșterea unor *vârfuri vegetative*, *radiculare*, pe medii de cultură sterile. Experimente asemănătoare au fost întreprinse și de către *Gautheret*, în Franța, în laboratorul de la Sorbona al lui *Molliard*, și de către *White*, în SUA. *White*, în anul 1932, la Institutul Rockefeller de Cercetări Medicale, a inițiat un experiment vizând cultura de *rădăcini izolate* (utilizând ca material biologic rădăcini excizate, prelevate de la plantule de grâu), preocupat fiind de studierea rolului jucat de diferiții compuși minerali și organici, din mediile de cultură, asupra creșterii rădăcinilor excizate. El a urmărit influența exercitată de variați factori externi, cum ar fi concentrația și natura ionilor din mediul de cultură, aerarea culturilor, pH-ul mediilor, precum și rolul temperaturii și a luminii din mediul ambiant asupra evoluției rădăcinilor excizate de grâu. În experimentele sale, *White* a surprins faptul că rădăcinile, după o perioadă de creștere rapidă (care a fost urmată de un declin al intensității acestui proces), își stopează creșterea. Continuându-și experimentele cu vârfuri radiculare de tomate, cultivate pe medii utilizate și în studiile efectuate cu rădăcini excizate de grâu, dar la care a adăugat *zaharoză* (sursă de carbon organic cu valoare energetică), *White* (1934) a reușit ca din cultura inițială (primară) să poată opera nenumărate subculturi, fără ca în subcultură să se mai manifeste o diminuare a ratei de creștere a rădăcinilor ci, dimpotrivă, să se înregistreze o amplă ramificare a acestora. În anul 1936, *White* raporta realizarea celui de al 160-lea pasaj, în subcultura de rădăcini (subculturi practicate la intervale de 7 zile), rata medie, zilnică, de creștere în lungime a acestora cifrându-se la valoarea de 5 mm (după *Street* și *Henshaw*, 1966).

Gautheret, între anii 1934-1938, a reușit să mențină în viață fragmente de țesut *cambial* de salcie și de plop, semnalând – la nivelul acestor inoculi – după o perioadă de vitrocultură, apariția unor proliferări celulare. Fragmentele de cambiu au fost cultivate pe medii aseptice, gelificate, constând din soluție minerală *Knop* (1884), cu adaos de *dextroză*, *clorhidrat de cisteină*, *aneurină* (vitamină B_1 sau tiamină) și de acid 3-indolilacetic (AIA) (vezi pag. 128); la salcie, completarea mediului de cultură cu auxină (AIA) a condus la o puternică stimulare a proliferării celulelor cambiale, deasupra inoculilor regenerându-se un țesut *calusal*. În aceeași perioadă, *Nobécourt* (tot în Franța) raporta reușitele sale în cultivarea *in vitro* a unor explante

cambiale, prelevate din rădăcini metamorfozate de morcov, inoculate pe un mediu constând din soluție nutritivă *Knop* (1884) suplimentată cu mediu de cultură *Berthelot* (1934). Reluându-şi experimentele cu acelaşi tip de mediu, dar utilizând explante prelevate din *rădăcini metamorfozate de morcov*, *Gautheret* a sesizat nu numai o păstrare a viabilității celulelor inoculate, ci şi o proliferare a acestora, în urma multiplicării rezultând celule nediferențiate, de tip *calusal*. Ulterior, calusul a putut fi detaşat şi subcultivat, de repetate ori, pe medii proaspete, având o compoziție similară cu aceea utilizată la inițierea culturilor. Aceste rezultate experimentale au fost comunicate de *Gautheret*, în 9 ianuarie 1939, la Academia Franceză de Ştiințe. Cu câteva zile mai devreme, în 30 decembrie 1938, în SUA, *White* a comunicat rezultatele cercetărilor sale cu privire la obținerea de țesut calusal, nediferențiat, regenerat din procambiul prezent la nivelul unor inoculi constând din explante caulinare, prelevate din tulpini tinere de *Nicotiana*, cultivate *in vitro* pe mediul utilizat de el în culturile de rădăcini excizate de tomate, dar solidificat cu 0,5% agar-agar, calus care s-a comportat bine la subcultură.

Cei trei corifei au obținut *calus* (țesut proliferativ, nediferențiat), la nivelul explantelor *radiculare* de morcov sau a celor *caulinare* de tutun, care s-a pretat la un număr repetat de subculturi. Anul 1939 este considerat ca un moment de referință în ceea ce priveşte reuşita inițierii de către *Gautheret* şi *Nobécourt*, în Franța, şi *White*, în SUA, a *adevăratelor* vitroculturi de țesuturi vegetale, acceptat fiind faptul că doar *menținerea* în viață a unor explante tisulare sau a unor celule, fără realizarea de subculturi, *nu reprezintă o veritabilă* vitrocultură, ci doar dacă supraviețuirea celulelor este urmată de o proliferare celulară, după o primă repicare a inoculilor.

Spre deosebire de *Haberlandt*, care în experimentele sale s-a folosit de explante ce au constat din țesuturi cu celule mult prea *diferențiate* (structural şi funcțional), *Gautheret*, *Nobécourt* şi *White* au utilizat, în vitroculturile lor, explante care au conținut celule *meristematice* (*cambiu*) din care, prin proliferări repetate, a rezultat *calus*, ce s-a pretat cu succes la operațiuni succesive de repicare şi de subcultivare. Aceste experimente au marcat momentul istoric al primelor reuşite în culturi de țesuturi şi celule vegetale şi au deschis calea unui lung şir de cercetări referitoare la analizarea comportamentului în regim de vitrocultură a variate *tipuri* de explante, în dependență de *specie*, *constituție*, *natura* şi *mărimea*, în funcție de *condițiile de cultură*, prin condiții înțelegând atât mediile de cultură: *compoziție*, *consistență*, *pH* ş.a.m.d., cât şi factorii *ecofiziologici* care concură, sau nu, la buna evoluție *in vitro* a diferitelor categorii de cormofitoinoculi. La început, cercetările s-au axat pe probleme referitoare la studierea *limitei extreme* de divizibilitate a unor organelor vegetale, cu menținerea în regim de vitro-

cultură a capacităţii regenerative a fragmentelor rezultate, inoculate fiind pe variate medii de cultură, dar şi a urmăririi limitei minime de masă calusală care postrepicare poate creşte şi regenera un nou calus, apt de subcultură.

În experimentele sale, *White* (1939a) a constatat că la subcultivarea calusului de *Nicotiana* (un hibrid între *N. glauca* x *N.langsdorffii*), pe medii de cultură agarizate, s-a înregistrat o creştere a masei acestuia, fără ca celulele lui să se diferenţieze; în momentul transferării calusului repicat, pe medii de cultură lichide, calusul a continuat să crească, la suprafaţa acestuia formându-se muguraşi. Ulterior, *Skoog* (1944) – experimentând cu o aceeaşi linie de calus, ca şi *White* – a ajuns la concluzia că pe medii solide, o intensitate luminoasă mai mare şi o temperatură ambiantă mai ridicată, exercită o influenţă favorabilă asupra *proliferării* celulelor calusului, în timp ce, în mediile lichide, o iluminare slabă şi o temperatură mai coborâtă, facilitează diferenţierea de muguraşi, la suprafaţa acestuia.

Gautheret, prin studiile sale întreprinse între anii 1941-1945, a stabilit rolul jucat de *glucide* (în funcţie de natura şi concentraţia acestora), în creşterea calusului de morcov. Studii similare au fost făcute, ulterior, de către *Hildebrandt* şi *Riker* (1949,1953), *Nickell* şi colaboratorii (1950) şi de *Henderson* (1954) ş.a.m.d., pe calus regenerat din variate tipuri de explante tisulare, provenite din numeroase specii de dicotiledonate (după *Gautheret*, 1959).

Ball (1946), experimentând cu apexuri prelevate din muguri de *Tropaeolum* şi de *Lupinus*, a stabilit faptul că *meristemul* caulinar este partea mugurelui răspunzătoare de naşterea – pe cale vegetativă – a unei noi plante, motiv pentru care *Gautheret* l-a considerat pe *Ball ca fiind părintele micropropagării*, el reuşind să regenereze vitroplantule din apexuri caulinare.

Experimentând cu ţesut *tumoral*, provenit din plante hibride de tutun (*N.glauca* x *N. langsdorffii*), *Skoog* (1944) a semnalat apariţia de muguraşi la nivelul vitroculturilor, dezvoltarea acestora fiind represată de prezenţa în mediul de cultură a auxinelor AIA (acidul β indolilacetic*) şi a ANA (acidul α naftilacetic); totodată, savantul a observat că procesul de *caulogeneză* poate fi stimulat prin adăugarea în mediile de cultură a *adeninei* (vitamina B_1), a *adenozinei* sau a *purinelor* (*Skoog* şi *Tsui*, 1951). Ulterior, în anul 1955, în laboratoarele profesorului *Skoog* a fost descoperită *chinetina* şi a fost descris rolul ei fiziologic, la plante, prin experimente în care s-a studiat comportamentul în *vitrocultură* a unor explante cilindrice de măduvă, de tulpini tinere de tutun. Dar, explantele inoculate şi crescute pe medii de cultură agarizate, având un conţinut complex în săruri minerale, plus glicină,

* sinonim cu acidul 3-indolilacetic

vitamine B şi zaharoză, au generat mici formaţiuni de calus, dezvoltate în zonele bazale ale acestora, ce treptat şi-au redus creşterea, în final aceasta încetând. Prin adăugarea de AIA în mediile de cultură creşterea calusurilor regenerate la nivelul fragmentelor s-a amplificat, dar nu s-a prelungit ca durată, după un timp creşterea calusurilor oprindu-se din nou. Pentru susţinerea creşterii calusurilor de tutun a fost necesară adăugarea în mediile de cultură a unui *extract de drojdie de bere*, extract care, de altfel, în compoziţia sa deţinea *purine*. Introducerea în mediile de cultură a mici cantităţi de 6 furfurilaminopurină, respectiv de *chinetină* (Kin), alături de AIA, a favorizat nu numai o continuare a creşterii calusurilor, ci şi iniţierea unor procese de organogeneză, cu susţinerea creşterii organelor neoformate la nivelul calusurilor. Prin aceste experimente, *Skoog* şi *Miller* (1957) au pus bazele metodologice ale influenţării proceselor de organogeneză, în sensul dorit de experimentator, fie spre *rizogeneză*, fie spre *caulogeneză*. *Chinetina* a fost izolată şi cristalizată în laboratoarele lui *Skoog*, din spermă de heringi, de către un colectiv alcătuit din *Miller, Skoog, Okumura, von Saltza* şi *Strong*. Mai apoi, o întreagă serie de substanţe – ce pot exercita efecte stimulatoare asupra declanşării diviziunilor celulare (activitate surprinsă tot în culturi de calus de tutun) – au fost denumite şi descrise de către *Miller* şi colaboratorii săi (în anul 1956), ca fiind *citochinine* (vezi pag.133) (*Street*, 1966a).

Descoperirile referitoare la rolul jucat de *fitohormoni* în procesele de morfo-şi organogenză au dat un puternic impuls cercetărilor axate pe studierea comportamentului *in vitro* a diferitelor categorii de explante, nu numai în ceea ce priveşte lărgirea gamei de specii şi de tipuri de inoculi cultivaţi cu succes pe medii aseptice, dar şi referitoare la amplificarea ratei de multiplicare a speciilor aflate în vitrocultură şi a gamei acestora, prin stimularea regenerării de vitroplantule, la nivelul inoculilor, apte de a fi *aclimatizate* la viaţă în condiţii naturale, în momentul transferării lor *ex vitro*.

În acea perioadă, o parte dintre cercetători şi-au orientat experimentele în direcţia iniţierii de vitroculturi, pornind de la o *unică* celulă, având ca ţel final regenerarea, din aceasta, a unei plante normal conformate. Pentru început, cercetătorii s-au mulţumit cu obţinerea de calus, având ca inocul iniţial o unică celulă.

Astfel, în anul 1954, *Muir* şi colaboratorii (de la departamentul de Fiziologia plantelor al Universităţii din Wisconsia) au comunicat reuşita lor în obţinerea de *suspensii celulare*, solitare, de *Tagetes erecta* şi de *Nicotiana tabacum*, derivate din culturi de calus practicate într-un mediu lichid, agitat. Ei au reuşit să izoleze celule, din culturi de calus friabil, originar din ţesut tumoral de crown-gall. Cultivarea *in vitro* a celulelor solitare s-a realizat prin amplasarea acestora pe mici pătrăţele din hârtie de filtru, aşezate dea-

supra unor vitrocalusuri, considerate ca fiind calusuri "doică". Aceste experimente, au permis dovedirea faptului că, prin hârtia de filtru, din calusuri au difuzat, ascendent, anumiți compuși bilogic activi, care au susținut nu numai supraviețuirea celulei solitare, ci și multiplicarea acesteia, astfel încât, după un timp, dintr-o unică celulă a rezultat un *microcalus*, formațiune nodulară care transferată pe medii proaspete, în subcultură, a generat o *clonă* celulară, originară din celula, care i-a dat naștere. Experimentul a dovedit posibilitatea obținerii de calus sau de linii celulare, din culturi de celule solitare.

În anul 1955, *Steward* și *Shantz* (de la Universitatea Corneill), studiind evoluția în vitrocultură a unor explante floemice (originare din radicele de morcov), inoculate în medii lichide, au constatat faptul că – după câteva zile de cultură – supernatantul și-a mărit gradul de turbiditate, fenomen care s-a dovedit a fi datorat creșterii numărului de celule prezente în suspensie, ca rezultat al multiplicării celulelor desprinse din inocultatul inițial; utilizând supernatant din această cultură, ca inițiator al unor subculturi, s-a reușit o repicare în serie a suspensiilor celulare. *Reinert*, în anul 1956, lucrând în laboratoarele lui *White*, a evidențiat producerea de mitoze în suspensiile celulare de morcov, atât în cazul celulelor solitare, cât și în cel al aglomerărilor de celule, respectiv a vitroculturilor constând din noduli multicelulari.

De Ropp (1955), la microscopul cu contrast de fază, a reușit să observe suspensii celulare, solitare, cultivate într-o microcameră ce conținea un mediu de cultură lichid, remarcând că multe dintre celulele singulare s-au menținut în viață, o perioadă lungă de timp, fără a se divide. Autorul a ajuns la concluzia potrivit căreia, în condițiile experimentale date, în general, aproximativ 10-15 celule reprezintă limita minimă, ca număr de celule, a inoculului constând din suspensii celulare, din care o clonă celulară poate fi reconstituită.

Torrey (1957) a realizat *vitroculturi celulare într-o microcameră* improvizată dintr-o lamă de microscopie prevăzută cu rigolă, acoperind rigola cu o lamelă. Pe fața inferioară a lamelei, el a aplicat o picătură de mediu de cultură agarizat, în centrul picăturii (după solidificarea mediului), amplasând o mică grămăjoară de calus, provenit dintr-un țesut cambial inițiat din rădăcini de mazăre; în imediata apropiere a calusului (utilizat drept calus "doică"), la o oarecare distanță de acesta, *Torrey* a dispus radiar o serie de celule solitare; lamela astfel pregătită a fost aplicată cu fața în jos, suspendând culturile deasupra rigolei din lama de microscopie. După 24 de ore, cu toate că multe dintre celule și-au menținut viabilitatea, numai 8% dintre acestea au început să se dividă. După câteva săptămâni de vitrocultură, cele mai mari aglomerări celulare (generate în urma multiplicării

celulelor solitare), au deținut maximum șapte celule. *Torrey* (1959) a înregistrat succese în regenerarea de microcalusuri, cu modelul experimental al lui *Muir* și colaboratorii (1954) (descris anterior), în cazul în care culturile de celule solitare au fost amplasate deasupra unor culturi de calus "doică", la care hârtia de filtru a fost înlocuită cu o membrană poroasă, având pori de 0,5-0,7 μ (după *Street* și *Henshaw*, 1966).

În anul 1958, *Steward* și colaboratorii, și independent de aceștia *Reinert*, au descoperit și au descris procesul de *embriogeneză somatică*, identificat atât în cazul unor culturi de celule, cât și în cele de calus de morcov (*Daucus carota*). Mai apoi, *Steward* și colaboratorii (1964) au izolat vitroplantulele rezultate din embrionii somatici germinați *in vitro*; după transferarea lor *ex vitro*, s-a reușit obținerea din aceștia de plante normal conformate.

Pe o altă cale, *Jones* și colaboratorii (1960) au *cultivat celule* derivate dintr-un hibrid de tutun, într-o *picătură* de mediu de cultură lichid *suspendată* pe partea inferioară a unei lamele de microscopie, cu care s-a acoperit rigola unei lame de microscopie. Într-o astfel de picătură s-au aflat în cultură între 2-30 celule. Autorii menționați au observat faptul că frecvența diviziunilor a fost mai crescută atunci când în picătură s-a aflat un număr mai mare de celule; inițierea diviziunilor celulare, la nivelul unor culturi monocelulare, a fost observată numai atunci când mediul de cultură a fost "condiționat" cu un adaos de mediu de cultură lichid, provenit dintr-o altă cultură, în care a fost crescută (în antecedență) o suspensie similară de celule. Tot în anul 1960, *Bergmann* a etalat o vitrocultură de suspensii celulare de *Nicotiana* și de *Phaseolus* (cu 90% celule solitare), deasupra unui strat pelicular de mediu de cultură agarizat cu 0,6% agar (de 1 mm grosime), în care a introdus și 7% lapte de nucă de cocos. Cultura realizată a expus-o la lumină difuză. După un timp, *Bergmann* a observat că celulele solitare au dat naștere la mici colonii de celule – în procent de 20% – colonii care, ulterior, au generat microcalusuri. Fiecare dintre microcalusurile generate pe suprafața plăcii de mediu agarizat și-au avut originea în câte o unică celulă. Microcalusurile, prelevate și subcultivate separat, au generat, fiecare în parte, *linii* provenite din culturi monocelulare. Această metodă, ulterior, a fost mult exploatată în procedurile de vitroameliorare și de selectare *in vitro* de noi genotipuri, mai rezistente în raport cu agentul folosit ca factor de selecție, ori în condițiile administrării în mediile de cultură a unor agenți mutageni.

După *Street* (1966a), *Loo* (1945) a reușit primul să cultive – pe medii aseptice, lichide – apexuri caulinare de *Asparagus officinalis*, de cca. 5 mm, prelevate de la *plantule*, susținând explantele pe suporturi constând din vată

de sticlă; periodic, la intervale de 5 până la 23 zile, s-au operat subculturi de apexuri, de o aceeaşi mărime, prelevate de la plantulele generate *in vitro*, derivate din culturile primare de apex. În aceste condiţii experimentale, pe medii de cultură lichide, anorganice, cu adaos de 2% zaharoză, la lumină, cultura de *Asparagus* a putut fi păstrată şi înmulţită timp de nouă luni; adaosul de vitamine B şi de adenină, nu a îmbunătăţit evoluţia culturilor.

În anul 1946, *Loo* a raportat o prelungire a menţinerii creşterii fragmentelor apicale de asparagus, în subcultură, timp de 22 luni, în situaţia în care vata de sticlă a fost înlocuită cu un substrat agarizat cu 0,5% agar-agar. Totodată, *Loo* a reuşit să crească *in vitro* vârfuri de tulpini de *Cuscuta campestris*, cunoscuta plantă superioară, parazită.

Explantele care au *meristeme*, şi se constituie în inoculi iniţiali, prezintă multiple avantaje, prin aceea că în vitrocultură astfel de inoculi se comportă ca un mini- sau *microbutaş*, care posedă structuri morfoanatomice deja organizate, ceea ce permite evitarea riscului apariţiei de variaţii, în decursul proceselor de multiplicare celulară, din inoculi – în condiţii optime de cultură – regenerându-se *clone*, fragmentele respective evoluând ca şi oricare butaş ce creşte, după detaşarea lui din corpul plantei mame şi amplasarea acestuia într-un substrat adecvat de cultură, în condiţii ecofiziologice propice, optime susţinerii fenomenelor regenerative şi de dezvoltare, diminuându-se la maximum accidentele de producere a unor anomalii cromozomiale, în marea majoritate a situaţiilor similare acest risc fiind, de regulă, practic nul.

Dar, culturile de *meristeme apicale*, radiculare sau caulinare, prezintă şi avantajul că în celulele meristematice infecţiile virale fie sunt absente, fie sunt foarte reduse. Astfel, încă *White* (1934), în cercetările sale efectuate în direcţia evidenţierii prezenţei infecţiilor virale în culturile derivate din *vârfuri radiculare* (prelevate de la plante mame de tomate polivirusate), a relevat faptul că o parte dintre vitroculturile regenerate din explantele meristematice au fost lipsite atât de virusuri, cât şi de alţi agenţi patogeni (după *Wang* şi *Charles*, 1991). Datorită acestor descoperiri, *White* a fost considerat ca fiind *primul* care a stabilit posibilitatea utilizării culturilor de meristeme apicale, pentru regenerarea de vitroculturi în care virusurile să fie absente. Ulterior, *Limasset* şi *Cornuet* (1949) au dovedit că absenţa infecţiilor virale este reală nu numai la vitroculturile rezultate din vârfuri de rădăcini, ci şi la culturile rezultate din *apexuri caulinare*, cercetări care au stat la baza obţinerii de către *Morel* şi *Martin*, în anul 1952, de vitroplantule de dalie sănătoase, libere de viroze, utilizând ca inoculi – în iniţierea vitroculturilor – meristeme caulinare, apicale sau axilare, prelevate de la plante mame polivirusate, provenite din mediul natural. În anul 1960, *Morel* a ob-

ţinut, printr-o procedură identică, vitroplantule de *Cymbidium*, sănătoase. Reuşita acestor experimente i-au permis lui *Morel* (1964) să elaboreze o metodologie de micropropagare clonală *in vitro* a orhideelor libere de viroze, metodă preluată şi aplicată ulterior, pe scară largă, în producţia industrială, horticolă.

Această categorie de experimente a condus, la scurt timp, la declanşarea dezvoltării de industrii de *micropropagare clonală* a speciilor şi soiurilor valoroase din punct de vedere economic (îndeosebi a celor de interes horticol), cu mari implicaţii comerciale, care au beneficiat de cercetările efectuate în scopul cultivării *in vitro* a apexurilor şi a *meristemelor* caulinare, apicale sau axilare, în primul rând pentru obţinerea de culturi "*libere de viroze*", stocul de vitroplantule regenerate pe această cale servind ca sursă de minibutaşi în micropropagarea *in vitro* a plantelor elită, prin producerea de material de plantat de cea mai bună calitate, dar şi pentru constituirea unor "bănci" cu vitroculturi vegetale.

O altă direcţie de cercetare în vitrocultură, extrem de fertilă, s-a dovedit a fi aceea a generării de embrioni, din celule *generative*, cu producere de *haploizi*. Plantele haploide sunt deosebit de valoroase în ameliorare, întrucât ele permit scurtarea considerabilă a duratei de generare a unor *linii homozigote*, diminuându-se astfel dificultatea identificării şi a manipulării caracterelor utile, haploizii fiind un material biologic ideal în obţinerea şi selectarea de mutante.

La angiosperme, izolarea de ţesuturi haploide – în culturi de antere de *Tradescantia reflexa* – a fost comunicată în anul 1963 de către *Yamada* şi colaboratorii. În anul 1964, *Guha* şi *Maheshawari* au identificat, în culturi de antere de datură (*Datura inoxia*), structuri embrionare originare din polen imatur. Mai apoi, în anul 1967, *Bourgin* şi *Nitsch* au obţinut – pentru prima dată – plante haploide din culturi de antere, de tutun (*Nicotiana tabacum*). Aceste cercetări au resuscitat interesul geneticienilor şi cel al amelioratorilor, pentru obţinerea, într-o perioadă cât mai scurtă de timp, de *haploizi* şi de plante homozigote.

Izolarea de *protoplaşti*, pe cale enzimatică, în condiţii sterile, a creat posibilitatea cultivării lor *in vitro*, pe mediu de compoziţii chimice şi osmolarităţi care să fie optime asigurării menţinerii acestora în viaţă. Protoplaştii sunt obţinuţi artificial prin denudarea enzimatică, menajată, a celulelor vegetale, fiind constituiţi din întreg conţinutul viu al celulelor, învelit în plasmalemă. În anul 1960, *Cocking* a fost primul care a utilizat *celulază* în scopul izolării de protoplaşti, enzima preparată din ciuperca *Myrothecium verrucaria*. Ulterior, pentru eliberarea protoplaştilor *Takebe* şi colaboratorii (1968) au folosit *macerozimă*, preparat bogat în *pectinază*. Aceştia au reuşit

izolarea de protoplaşti din fragmente mici de limb foliar (în prealabil jupuindu-se epiderma inferioară a acestora), care au fost plasmolizate şi incubate într-o soluţie de macerozimă; suspensiile celulare rezultate au fost tratate cu o soluţie de *celulază*, pentru hidroliza pereţilor celulari, pectocelulozici, obţinându-se – în final – o completă denudare a protoplaştilor. Sursele vegetale din care pot fi izolaţi protoplaşti, cu mai mare uşurinţă, sunt variate. În general, cel mai ridicat randament în obţinerea de protoplaşti a fost atins în cazul utilizării frunzelor tinere, respectiv a celulelor aparţinătoare mezofilului foliar al acestora (pentru detalii vezi capitolul 5).

Regenerarea de plante din protoplaşti a fost realizată, în anul 1971, de către *Takebe* şi colaboratorii săi. Subliniem faptul că, încă din faza de degradare enzimatică a pereţilor celulari, protoplaştii pot *fuziona* spontan. Prima fuziune spontană a protoplaştilor a fost raportată de către *Power*, în anul 1970. Apoi, în anul 1972, *Carlson* şi colaboratorii au comunicat obţinerea primului *hibrid somatic*, interspecific, realizat prin *fuzionarea protoplaştilor* de *N. glauca* cu cei de *N. langsdorffii*. În anul 1978, *Melchers* şi colaboratorii au produs un prim hibrid somatic, prin fuzionarea protoplaştilor a două *genuri* vegetale, respectiv între tomate şi cartofi.

La nivelul protoplaştilor, însă, pot fi făcute o serie de manipulări genetice. Astfel, în urma înlăturării pereţilor celulari, pectocelulozici, în celulele vegetale pot fi încorporate diferite molecule, cum sunt cele de acizi nucleici (sau secvenţe ale acestora), ori organite celulare, microorganisme sau vectori (plasmide ori liposomi), purtători de variate informaţii genetice.

Privind retrospectiv istoricul descoperirilor făcute în domeniul vitroculturilor vegetale, pot fi enumerate următoarele momente principale:

1902 *Haberlandt* a fost primul care a formulat explicit ipoteza *totipotenţialităţii celulelor vegetale* şi a iniţiat cultivarea *in vitro* a acestora;

1904 *Hanning* a reuşit cultivarea *embrionilor zigotici*, de crucifere;

1922 *Knudson* a realizat, *in vitro*, *germinarea asimbiotică* a semincţelor de *orhidee*;

1922 *Kotte* şi *Robins* au fost primii care au crescut *in vitro apexuri radiculare* de mazăre şi de porumb, pe variate medii de cultură, dar nu au realizat şi subcultivarea acestora;

1929 *Laibach* a reuşit cultivarea *embrionilor zigotici* de *Linum*, rezultaţi dintr-o încrucişare incompatibilă;

1934 *Gautheret* a obţinut regenerarea de *calus* la nivelul unor vitroculturi constând din explante de cambiu sau din floem de plante lemnoase;

1934 *White* a reuşit cultivarea *in vitro* a unor *rădăcini* de tomate, pe o durată nedefinită de timp, prin operarea periodică de subculturi;

1934 *Kögl* şi colaboratorii au *identificat* proprietăţile fitofiziologice ale *acidului 3-indolilacetic* (auxina);

1939 *Gautheret, Nobécourt* şi *White*, au realizat cu succes iniţierea unor culturi de *calus, in vitro*, şi **subcultivarea** acestuia, anul 1939 fiind un an de referinţă în literatura de specialitate, considerat ca moment al *naşterii domeniului culturilor de ţesuturi şi celule vegetale*, respectiv a biotehnologiei care are ca obiect inoculii cormofitici;

1941 *Van Qverbeek* a descris efectul stimulator al laptelui din nuca de cocos, utilizat ca adaos la mediile de cultură, ca factor de dinamizare a mitozei, în celulele culturilor embrionare de *Datura*;

1942 *White* şi *Braun* au reuşit cultivarea *in vitro* a ţesuturilor *tumorale*;

1943 *White* a publicat lucrarea: *A handbook of plant tissue culture*. Ed. The Jaques Cattel Press, Lancaster (277 p);

1944 *Gautheret* a publicat lucrarea: *Une voie nouvelle en biologie végétale – La culture des tissus*. Ed. Gallimard, Paris (202 p);

1946 *Ball* a obţinut, în regim de vitrocultură, *regenerarea de plante* din *apexuri caulinare* de *Lupinus* şi de *Tropaeolum*, *Gautheret* considerându-l pe acesta ca părinte al *micropropagării*;

1948 *Skoog* şi *Tsui* au descoperit răspunsul diferenţiat al explantelor de tutun, în ceea ce priveşte caulo- şi rizogeneza;

1950 *Ball* a descris organogeneza la nivelul calusului de *Sequoia sempervirens*;

1952 *Morel* şi *Martin* au publicat reuşita lor în *regenerarea de plante libere de viroze*, în vitroculturi având ca inoculi *meristeme apicale, caulinare*, de *Dahlia*;

1953 *Tulecke* a obţinut *in vitro calus haploid* de *Ginkgo biloba*;

1954 *Muir* şi colaboratorii (în laboratoarele lui *Haberlandt*) au realizat *suspensii celulare* de *Tagetes erecta* şi de *Nicotiana tabacum*, care au suportat cu succes subcultivarea şi clonarea, cu regenerarea de vitroplantule, având ca punct de plecare *o unică celulă*;

1955 *Miller* şi colaboratorii, în laboratoarele lui *Skoog*, au descoperit *chinetina*, hormon responsabil – alături de auxină - de mitoza celulelor vegetale;

1957 *Skoog* şi *Miller* au descoperit nu numai rolul *chinetinei* în reglarea formării de muguraşi, la nivelul inoculilor vegetali derivaţi din diferite tipuri de explante, ci şi a faptului că *rizogeneza* şi *caulogeneza* variază – ca prezenţă şi amplitudine – în funcţie de raportul dintre citochinină/auxină, din mediul de cultură, relaţie care a primit denumirea de *balanţa hormonală*;

1957 *Torrey* a realizat *subcultivarea* în "picătură suspendată" a *unei suspensii de celule*;
1958 *Steward* şi colaboratorii, şi separat *Reinert*, au obţinut regenerarea de *embrioni somatici*, din culturi celulare sau din calus, de morcov;
1960 *Morel* a reuşit, prin vitrocultură, iniţiată din culturi de meristeme, *micropropagarea* la *Cymbidium* (culturi libere de viroze), prin subculturi de *protocormi*;
1960 *Jones* şi colaboratorii au realizat, cu succes, o *microcultură de celule*, pe o lamă de microscopie cu rigolă;
1960 *Bergmann*, prin filtrarea unei suspensii celulare, a reuşit izolarea de celule, iar prin etalarea acestora, pe o placă agarizată, din fiecare celulă obţinând *microcalusuri*, regenerând din ele linii celulare;
1960 *Cocking* a izolat *protoplaşti*, *pe calea hidrolizei* enzimatice a pereţilor celulari, pectocelulozici;
1961 *Kanta* a realizat vitrofecundarea la *Papaver rhoeas*;
1961 *Torrey* a semnalat *instabilitatea genetică* a celulelor aflate în vitrocultură;
1962 *Murashige* şi *Skoog* au *conceput un foarte bun mediu de cultură*, util în creşterea *in vitro* a variatelor categorii de explante;
1964 *Guha* şi *Maheshwari* au realizat – pentru prima dată – *plante haploide*, din culturi de *antere* de *Datura innoxia*;
1965 *Aghion-Prat* a obţinut inducerea antezei *in vitro*, la tutun;
1964-1965 *Vasil* şi *Hildebrandt* şi-au publicat rezultatele lor în diferenţierea de plante de tutun, din microculturi derivate din celule izolate;
1966 *Guha* şi *Maheswari* au regenerat plante *haploide* de *Datura* din grăuncioare de *polen* germinate *in vitro*;
1969 *Eriksson* şi *Jonannsen* au făcut prima izolare de protoplaşti dintr-o suspensie de celule de *Haplopappus gracilis*;
1970 *Carlson* a selectat, din vitrocultură, mutante biochimice;
1970 *Power* a reuşit prima fuziune de protoplaşti;
1971 *Takebe* şi colaboratorii au fost primii care au obţinut *regenerarea de plante* din *protoplaşti* de *N. tabacum*;
1972 *Carlson* şi colaboratorii au realizat primul *hibrid somatic*, interspecific, între *N. glauca* şi *N. langsdorffii*;
1975 *Seibert* a obţinut regenerarea de vitroplantule din apexuri de garoafe care au fost crioconservate;
1977 *Chilton* şi colaboratorii au semnalat integrarea în genomul plantelor superioare a AND-ului plasmidial de *Agrobacterium tumefaciens*;
1981 *Larkin* şi *Scowcroft* au lansat termenul de *variaţie somaclonală*;
1982 *Zimmermann* a obţinut, prin electrofuziune, hibrizi somatici;

1984 *Pszkowski* şi colaboratorii au realizat transformarea vitroculturilor vegetale cu AND plasmidal;

1985 *Horsch* şi colaboratorii au reuşit regenerarea de plante, prin vitrocultură, transformate fiind prin infectarea inoculilor constând din explante foliare cu tulpini de *Agrobacterium tumefaciens*;

1978 *Melchers* a obţinut primul *hibrid somatic intergenuri*, respectiv între tomată şi cartof;

Dacă facem o analiză a progreselor realizate în cercetările efectuate cu explante prelevate de la specii de cormofite, în domeniul culturilor de organe, ţesuturi, celule sau de protoplaşti, se poate aprecia faptul că, în evoluţia descoperirilor înregistrate de-a lungul timpului, au existat cinci etape importante, şi anume:

1. –la baza investigării *capacităţii regenerative* a ţesuturilor şi a celulelor vegetale, la plantele superioare, s-a aflat teoria formulată – între anii 1838-1839 – de către *Schleiden* şi *Schwann*, legată de unitatea structurală, celulară, a vieţuitoarelor şi a totipotenţei acestor celule. Tot în secolul XIX, sunt de menţionat şi cercetările lui *Vöchting*, şi cele ale lui *Rechinger*, privind supravieţuirea şi manifestarea capacităţii regenerative a unor fragmente vegetale (butaşi), a căror talie a fost redusă la dimensiuni din ce în ce mai mici. Perioada speculaţiilor teoretice se poate considera că s-a încheiat în momentul în care *Haberlandt* (1902) a formulat ipoteza sa cu privire la faptul că fiecare celulă vegetală, diploidă sau haploidă, conţine în genomul său întreaga informaţie ereditară necesară "reconstituirii" pe cale vegetativă a organismului din care aceasta a provenit, fenomen pe care *Haberlandt* – primul în lume – a încercat să-l dovedească experimental cultivând ţesuturi şi celule vegetale în condiţiile detaşării lor din corpul plantelor, acţiune care însă a eşuat din cauză că explantele inoculate *in vitro* deţineau celule mult prea diferenţiate morfofiziologic, respectiv epidermă, peri şi mezofil foliar, imposibil de dediferenţiat, mai ales în lipsa din mediul de cultură a unor compuşi de tip fitohormonal, necunoscuţi la acea dată;
2. –între anii 1902-1922, în Germania, Franţa şi în SUA, a urmat o întreagă campanie de cercetări experimentale, orientate în direcţia dovedirii capacităţii regenerative a explantelor vegetale, tisulare sau celulare. Primele încercări au eşuat însă, din mai multe motive; în principal, la baza eşecului a stat lipsa – la acea dată – a cunoştinţelor ştiinţifice referitoare la relaţia dintre structura şi funcţiunea celulelor vegetale cu grad diferit de maturitate, respectiv cu

privire la diferențierea morfofiziologică și posibilitatea sau imposibilitatea acestora – detașate fiind de la locul lor de origine – de a-și manifesta capacitatea regenerativă (potrivit informației deținute în genomul fiecărei celule, în parte), în funcție de condițiile de mediu în care ele sunt crescute. Reușita unor astfel de încercări, după cum se va vedea, rezidă în abilitatea experimentatorului de a readuce celula diferențiată din punct de vedere morfofiziologic, la starea de celulă *meristematică*, printr-o *dediferențiere* a celulelor adulte, manipulând factorii ambientali. Cea mai simplă cale de inițiere a unei vitroculturi – după cum s-a dovedit ulterior – constă în utilizarea de explante ce dețin în morfostructura lor celule meristematice. Pe de altă parte, în acea perioadă nu erau încă descoperiți *fitohormonii* și nu erau cunoscute cerințele nutriționale ale cormofitoinoculilor, în ceea ce privește necesarul de substanțe indispensabile inoculilor vegetali, care trebuie să fie prezente în substratul de cultură, sub raportul naturii și a concentrațiilor optime a acestora în mediile de cultură, compuși necesari nu numai pentru menținerea în viață a celulelor, ci și pentru reamorsarea și susținerea proceselor de multiplicare, de regenerare și de morfogeneză, atât în *cultura primară*, cât mai ales în *subcultură*. În acea perioadă, nu erau cunoscute – în suficientă măsură – nici aspectele legate de regimul de viață *heterotrof* sau *mixotrof* pe care îl manifestă explantele vegetale inoculate *in vitro*, respectiv *rolul* jucat de *glucide*, ca resurse energetice, natura și concentrația acestora, parametri optimi ai regimului *ecofiziologic* în care vitroculturile trebuie să fie menținute, pentru a se putea asigura nu numai supraviețuirea lor, ci și proliferarea celulelor inoculilor aflați în cultură, diferențierea celulelor nou formate și regenerarea de *vitroplantule*, din cormofitoinoculii de natură și mărimi variate;

3. –în perioada anilor 1922-1939 s-au înregistrat primele succese în domeniul vitroculturilor vegetale, respectiv în culturile de *embrioni zigotici* (*Hanning*), dar și în culturile de *rădăcini* (*White*), în geneza de *calus*, precum și în creșterea și subcultivarea acestuia (*Gautheret, Nobécourt* și *White*), perioadă care a fost considerată ca fiind de *pionierat* în biotehnologia vegetală;
4. –între anii 1939-1965, descoperiri importante făcute în fitofiziologie, referitoare la chimismul și *nutriția* minerală a plantelor, precum și în descifrarea proceselor de *creștere* și de *dezvoltare* (în primul rând prin descoperirea și studierea efectelor *fitohormonilor* și a diferiților regulatori de creștere, de sinteză); a proceselor de

metabolism, cu precădere a *fotosintezei*, au făcut ca această perioadă să fie considerată ca fiind etapa în care s-au realizat şi cei mai importanţi paşi în domeniul vitroculturilor vegetale, în obţinerea de vitroplantule *libere de boli* (în principal de viroze), prin prelevarea şi inocularea *in vitro* de meristeme caulinare, apicale şi axilare, vitroplantule testate ca fiind libere de viroze urmând calea micromultiplicării, respectiv a clonărilor lor pe medii aseptice, prin minibutaşi, propaguli sau, la orhidee, prin protocormi, cercetări care au permis elaborarea de variate tehnologii de înmulţire a plantelor în vitrocultură, în regim industrial, cu producerea de material de plantat, certificat din punct de vedere genetic şi fitosanitar. În reuşita obţinerii unui randament profitabil în aceste ramuri de producţie, cercetările au fost orientate şi în direcţia diminuării pierderilor în fazele de iniţiere a vitroculturilor, precum şi a celor cauzate de nereuşitele înregistrate în decursul procedurilor de *aclimatizare* a vitroplantulelor la viaţa "ex vitro", pierderi ce grevează asupra costurilor de producţie, respectiv asupra preţului de livrare a materialului de plantat rezultat prin astfel de practici. Calculele economice şi cerinţele pieţelor de desfacere, interesate în achiziţionarea de material săditor, certificat din punct de vedere calitativ, sunt factori care reglează extinderea acestor tehnici moderne de multiplicare şi de propagare a plantelor;

5. -din anul 1965 şi până în prezent, se poate spune că a urmat o perioadă caracterizată prin ceea ce se numeşte *etapa modernă* a *vitroculturilor vegetale*, perioadă în care a avut loc o extindere a "*revoluţiei verzi*", care priveşte nu numai înmulţirea *in vitro* a cormofitelor de interes economic, în regim intensiv, industrializat, ci şi practicile moderne de inginerie genetică, de stresselecţie, de mutageneză şi de hibridare somatică, efectuate *in vitro* în scopul obţinerii de noi genotipuri, precum şi procedurile de cultivare pe medii aseptice a celulelor, fie în scopul obţinerii de *embrioni somatici* (iar din aceştia de *seminţe artificiale*), fie în scopul producerii de *biomasă*, utilizabilă ca materie primă într-o serie de industrii (cu precădere chimică, fitofarmaceutică şi alimentară); dar, "revoluţia verde" priveşte şi *conservarea* genofondului natural, ori a genotipurilor nou create prin practicile de ameliorare sau prin tehnicile de inginerie genetică, în *Bănci de gene*, metodologii importante care au intrat în atenţia multor cercetători, mai ales după anul 1980. Actualmente, fiecare laborator de cercetare sau de producţie s-a dotat cu instalaţii frigorifice de stocare sau de crio-

conservare a vitroculturilor, materialul biologic conservat fiind utilizat fie ca *sursă de germoplasmă* (în ameliorare), fie ca sursă de material iniţial, certificat, disponibil pentru micropropagare clonală sau pentru efectuarea de schimburi internaţionale.

Studiile efectuate în epoca modernă privesc şi extinderea vitroculturilor la cât mai multe specii de cormofite, în scop de cercetare sau în scopuri industriale, pe un prim loc situându-se experimentele menite să vină în sprijinul producţiei, respectiv a optimizării costurilor ori a eficientizării lanţurilor tehnologice, prin reducerea volumului de muncă efectuat de către operatori umani, urmărindu-se o *automatizare* a unor etape de lucru sau chiar *robotizarea* acestora.

Bajaj estima, în anul 1991, că aproximativ 1000 de specii vegetale pot fi micropropagate *in vitro*. Pe lângă avantajele pe care le prezintă culturile "in vitro", vitroplantulele – sterile fiind – se pretează mai uşor la *export*, ele putând fi vehiculate cu facilitate peste barierele vamale. Plante generate *in vitro*, după aclimatizare, pot fi comercializate în ţara care le-a produs, fie pot fi exportate în alte ţări.

Experimentele efectuate în perioada anilor de pionierat ai biotehnologiei vegetale au condus la desprinderea câtorva concluzii importante, şi anume: 1. - *totipotenţa celulelor vegetale* este un fenomen real, dar această capacitate – în plantă sau în organele integre (cel puţin în anumite faze de vegetaţie) – este *reprimată* şi nu se poate exprima atât timp cât celulele se află inserate în situsul lor natural; exteriorizarea totipotenţei şi manifestarea totală sau parţială a acesteia (doar sub o anumită formă), poate fi provocată şi susţinută (în exprimarea sa) de prezenţa unor anumiţi *stimuli*, endogeni sau exogeni, care să corespundă ca mesaj declanşării acestor fenomene, cu condiţia ca şi factorii de mediu să favorizeze desfăşurarea proceselor în cauză; 2. - între celulele unui organism vegetal, pluricelular, există anumite *corelaţii*, bazate pe interrelaţii stabilite între celule, ţesuturi şi organe, celulele neputându-şi manifesta autonomia decât după explantarea şi cultivarea lor *in vitro*, în condiţii optime; 3. - explantele care conţin celule mult prea diferenţiate (cum sunt celulele colenchimatice şi celulele caliptrale), prezintă un avansat determinism funcţional, ceea ce face ca acestea – în regim de autonomie, chiar şi în condiţii optime – să nu-şi mai poată manifesta şi exprima totipotenţa.

Cele mai importante progrese în domeniul culturilor de ţesuturi şi celule vegetale au fost făcute, cu precădere, după anul 1960, etapă în care au fost realizate numeroase descoperiri referitoare la aplicaţiile practice ale biotehnologiei vegetale, dar şi descoperiri de larg interes ştiinţific.

Prin *selecții practicate in vitro* s-au obținut, și se vor mai obține, plante rezistente la acțiunea unor agenți stresanți, cum ar fi la: sărăturare, pesticide, stres hidric, termic, la micotoxine etc. Tot prin vitroselecție și prin modificarea condițiilor ecofiziologice, prin *vitrocultură* s-au izolat linii celulare care au prezentat o evoluție bună pe medii *lipsite* de *glucide* și care pot trăi *în vitro*, în regim *fotoautotrof* (*Yamada* și colab., 1978; *Kozai* și colab. 1986-1991; *Cachiță*, 1987; *Cristea*, 1999). Astfel de vitroculturi se multiplică și cresc în *lipsa glucidelor din mediul de cultură*, chiar și în regim industrial. Exemplele sunt numeroase, vom menționa doar micropropagarea *in vitro*, în regim fotoautotrof, a garoafelor, crizantemelor, orhideelor, a cartofului ș.a.m.d. La vitroculturile fotoautotrofe, atmosfera din recipientele de cultură necesită o substanțială îmbogățire a conținutului în CO_2, iar cormofitoinoculii trebuie iluminați cu o intensitatea luminoasă sporită.

Un capitol special în experimentele efectuate cu țesuturi vegetale cultivate *in vitro* l-a constituit studiile vizând utilizarea acestora ca *modele experimentale* în cercetările de *fitopatologie*, în scopul analizării relațiilor și a reacțiilor care se stabilesc între agentul patogen (virusuri, bacterii, ciuperci, insecte, nematode) și planta gazdă, cu precădere în cazul apariției de *calusuri* ori de *tumori*, sau a altor tipuri de proliferări. Tumorile vegetale ca și tumorile animale, pot să fie generate de unii compuși chimici, sau de variați agenți biologici. Încă în anul 1940, *Braun* și colaboratorii au demonstrat că tumorile de tip "crown-gall" sunt induse de bacteria *Agrobacterium tumefaciens*; caracterul tumoral, odată dobândit, se păstrează pe o perioadă nelimitată de timp, întrucât informația genetică din genomul bacterian a fost inserată în genomul celulelor plantei gazdă. Creșterea *in vitro* a țesutului tumoral, mai ales a celui de tip "crown-gall", a servit ca model experimental în cercetările de *oncologie vegetală* (*Braun*, 1954, 1962; *Gautheret*, 1959; *Riker* și *Hildebrandt*, 1958). După *Braun* și *Lipetz* (1966), deși neoplasmele vegetale pot avea cauze diferite, bazele fiziologice și bazele biochimice ale creșterii autonome a celulelor tumorale par să fie aceleași. *Agobacterium tumefaciens*, bacterie care trăiește în mod natural în sol, deține capacitatea de a perturba ireversibil regularitatea diviziunilor celulare, modificând celula vegetală normală, într-o celulă tumorală. Această bacterie prezintă forme (tulpini) virulente care posedă o plasmidă ADN extracromozomală, denumită plasmidă Ti ("*tumor-inducing*"), de dimensiune mare, "vinovată" de proprietățile oncogene ale acestei bacterii. *Plasmidele* bacteriene, inclusiv plasmida naturală Ti, în genetica experimentală și în biotehnologia vegetală sunt folosite ca vectori în vehicularea diferitelor gene în genomul celulei plantelor, cu aceşti "cărăuși" urmărindu-se transformarea genetică a celulelor aflate în vitrocultură. Tot vectori naturali, utilizați în operațiunile

de transfer genetic, pot fi și tulpinile de *Agrobacterium rhizogenes*, bacterie care, la plante, la nivelul organelor atacate sau a țesuturilor aflate în vitrocultură, provoacă o boală neoplazică denumită "*haery root*" ("rădăcini fibroase sau păroase"), care constă în declanșarea apariției de nenumărate rădăcini adventive, în zona de penetrare a acestei bacterii; ambele specii de *Agrobacterium* pătrund în plante la nivelul unor leziuni. În cazul lui *A. rhizogenes*, plasmida asociată cu virulența bacteriei a fost abreviată Ri ("*root inducing*"). Transformări genetice au fost practicate și prin intermediul vectorilor virali sau al celor *liposomali*.

O altă direcție modernă de cercetare a constat în inserarea în protoplaști a unor organite celulare (cloroplaste sau nuclei), ori a unor microorganisme (alge sau bacterii, de exemplu a bacteriei *Azotobacter vinelándii*), în scopul transferării în celule eucariote a capacității azotofixatoare a acestora, cercetări care, până în prezent, nu au condus la reușite cu implementări practice majore. Dar, studiile din acest domeniu se află în plină expansiune.

Pe plan mondial, specialiștii din ramura biotehnologiei vegetale, respectiv a vitroculturilor cormofitice, sunt organizați (din anul 1972) într-o asociație internațională intitulată: *The International Association for Plant Tissue Culture* (IAPTC), asociație la care, din anul 1975, s-a afiliat și țara noastră.

Întrucât, culturile de țesuturi și celule vegetale s-au configurat ca o nouă ramură biotehnologică, la ultimul congres IAPTC de la Ierusalim, Israel, din anul 1998, asociația cultivatorilor de celule și țesuturi vegetale și-a schimbat denumirea în "*The International Association for Plant Tissue Culture and Biotechnology*" (IAPTC & B). Periodic, din patru în patru ani, această asociație – încă de la înființare – organizează congrese mondiale, cu care ocazie se publică volume ce conțin textul lucrărilor expuse în plen, și un volum cu rezumatele lucrărilor științifice prezentate în sesiunile de tip *poster*. Între congrese, asociația IAPTC & B editează o revistă de specialitate, pe care o distribuie membrilor săi și aduce la cunoștința specialiștilor din întreaga lume ultimele noutăți din domeniul vitroculturilor vegetale, publică rapoarte de activitate primite de la diferite laboratoare de acest tip, din întreaga lume și aduce la cunoștința membrilor săi toate manifestările mondiale și naționale, având teme care interferează cu acest domeniu de activitate, tipărind sinteze și recenzii de profil.

Pe lângă această asociație, există și o organizație europeană (*European Tissue Culture Society* – ETCS), cu același specific.

1.2.2. În România

La noi în țară, cercetări sistematice privind vitroculturile la cormofite au fost inițiate începând din anul 1975, la Institutul de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca, la facultatea de Biologie din București, la Facultatea de Farmacie din Iași, iar, mai apoi, la: Institutul de Cercetări și Producție Pomicolă Mărăcineni – Pitești, Institutul de Științe Biologice din București și din Iași (filiala de la Piatra Neamț), la Intreprinderea de Sere Codlea – Brașov, la institutele și stațiunile Agricole din Cluj-Napoca, Brașov, Roman, Bacău, Suceava etc. În momentul de față, în țara noastră există numeroase laboratoare de culturi de țesuturi și celule vegetale, amenajate în institute și centre cu profil biologic, agricol sau silvic, precum și în majoritatea unităților de învățământ superior axate pe biologie, agronomie sau silvicultură. În unele universități din țara noastră, disciplinele de biotehnologie au dobândit un statut permanent în programele de învățământ superior (în anul 1995, la Universitatea Agricolă din București, a luat ființă prima facultate de Biotehnologie, din țara noastră). În cadrul diferitelor forme de învățământ, biotehnologia vegetală își are un loc de sine stătător, bine reprezentat, atât la cursurile ordinare, cât și la formele de pregătire profesională, cum sunt cele de masterat sau de doctorat, ori de specializare postuniversitară.

În țara noastră, *prima* manifestare științifică, națională, consacrată domeniului *culturilor de țesuturi și celule vegetale*, a fost organizată în anul 1981, la Cluj-Napoca, de către Institutul de Cercetări Biologice din localitate, în colaborare cu Institutul Agronomic și cu Filiala clujană a Academiei Române, coordonatorul manifestării, precum și a volumului editat cu această ocazie, fiind dr. *Dorina Cachiță-Cosma*. Volumul a fost intitulat, "*Culturile de țesuturi – instrument de cercetare în biologia vegetală, teoretică și practică*". La simpozion, s-au prezentat numeroase referate de sinteză, marea lor majoritate constând din date cu caracter preponderent teoretic sau metodologic, lucrări care s-au dovedit a fi utile în evoluția ulterioară a laboratoarelor de vitroculturi vegetale din țara noastră, ca bibliografie de referință, cu atât mai mult cu cât documentarea științifică din țara noastră, în acea perioadă, era precară.

Cel de al "*II-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale*" a fost organizat în anul 1983, la Pitești, de către Institutul de Cercetări și Producție Pomicolă Mărăcineni, prin grija neobositei cercetătoare inginer *Tatiana Coman*. Comunicările științifice prezentate cu acea ocazie au fost cuprinse în două volume, editate prin grija Academiei de Științe Agricole și Silvice, din România. La cea de a doua manifestare națională, cu

profil de biotehnologie vegetală, au fost comunicate numeroase lucrări științifice, rezultate în urma studiilor efectuate de către cercetătorii români, studii și experimente făcute în țara noastră sau în laboratoare din străinătate, vizând atât sfera studiilor cu caracter fundamental, cât și a cercetărilor cu caracter aplicativ.

Între primul și cel de al doilea simpozion național de culturi de țesuturi și celule vegetale s-a intercalat o manifestare științifică, națională, organizată la București, axată pe problema *protoplaștilor*, respectiv *simpozionul* intitulat: "*Utilizarea protoplaștilor în cercetarea biologică - realizări și perspective*", lucrări publicate în anul 1984, într-un volum editat de către Institutul Central de Biologie din București, sub îngrijirea doamnei dr. *Aurelia Brezeanu*.

Cel de al "*III-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale*" a fost organizat tot la București în anul 1985, de către mai multe unități ce cercetare din capitală, sub conducerea Societății de Științe Biologice, prin grija profesorului universitar dr. *Ion Anghel* și a doamnei dr. *Aurelia Brezeanu*. Lucrările prezentate la acel simpozion au fost tipărite într-un volum de către Universitatea din București, în care se află inserată și o listă bibliografică cu lucrările științifice publicate, până la acea dată, în domeniul biotehnologiei vegetale (vitroculturi de celule și țesuturi vegetale), de către specialiștii români. Primele articole științifice axate pe această problematică de cercetare au văzut lumina tiparului în anul 1976, în Belgia și Franța (*Cachiță* și *Homès*; *Homès* și *Cachiță*; *Cachiță* și colab., a și b) și în Germania, în anul 1978 (*Negruțiu*, *Jacobs* și *Cachiță*). Comunicările susținute la cel de al III-lea simpozion național din țara noastră au relevat faptul că cercetătorii români și-au lărgit gama temelor abordate în domeniul biotehnologiei vegetale, cu probleme referitoare la lucrări de inginerie genetică, constând în transfer de gene, mediat de vectori plasmidiali, proveniți de la tulpini de *A. tumefaciens*, precum și cercetări privind hibridarea parasexuată, indusă chimic sau electric, ori cu cercetări vizând obținerea principiilor farmacologic-active, prin culturi de celule sau de calus, ori cu cercetări de haploidie experimentală, sau prin studii de modulare a proceselor de citodiferențiere și de morfogeneză, ori prin experimente vizând elucidarea mecanismelor responsabile de inducerea variabilității genetice, și altele. În paralel cu lărgirea sferei preocupărilor în aceste direcții de cercetare, trebuie menționat și faptul că, din participarea cu comunicări, s-a putut deduce o creștere semnificativă a numărului de laboratoare și de specialiști, din țara noastră, implicați în astfel de studii.

În primăvara anului 1986 a avut loc, la Grădina Botanică din Jibou (grație eforturilor făcute de profesorul *Vasile Fati*, directorul acestei institu-

ții, aparținătoare Ministerului Educației și Cercetării), *Seminarul Științific, cu caracter național*, intitulat: "*Dezvoltarea unor tehnologii – biotehnologii – în țara noastră, în cincinalul revoluției tehnico-științifice 1981 – 1985*", manifestare organizată cu ocazia inaugurării, în acea unitate, a laboratorului de vitroculturi vegetale.

Eforturile întreprinse – pe plan național – de către diferite institute, în popularizarea acestui nou domeniu al biologiei, au făcut ca biotehnologia vegetală să câștige cât mai mulți adepți, iar specialiștii din țara noastră să se familiarizeze cu această modernă problematică de cercetare.

În anul 1988 a intrat oficial în funcțiune, la Întreprinderea de Sere Codlea, Brașov, prima unitate industrială de micropropagare *in vitro* a speciilor horticole (în principal a garoafelor), libere de viroze, instituție la care consultant științific a fost dr. *Dorina Cachiță-Cosma*; la acea dată, laboratorul de biotehnologie vegetală de la Serele Codlea era condus de ing. *Cornelia Sandu*, secondată de biolog *Dana Constantinovici*.

Cel de al "*IV-lea Simpozion Național de Culturi de Celule și Țesuturi Vegetale*" a avut loc la Cluj-Napoca, în decembrie 1989, organizat fiind de Institutul de Cercetătri Biologice din localitate, simpozion intitulat: "*In Vitro Explant Cultures – Present and Perspective*". Lucrările simpozionului au văzut lumina tiparului în anul 1990 (coordonatorul volumului și organizator al simpozionului fiind dr. *Dorina Cachiță-Cosma*). Volumul a cuprins peste 60 de articole științifice, care au abordat un spectru foarte larg de probleme, în principal acestea privind: - regulatorii de creștere și mecanismele lor de acțiune; - biosinteza metaboliților secundari, la cormofito-inoculi; - transferul interspecific de gene; - vitroculturile fotoautotrofe; - micropropagarea *in vitro*; - studii privind influența unor factori ecofiziologici sau a unor compuși cu acțiune bioactivă, asupra diferitelor tipuri de vitroculturi; - cercetări vizând utilizarea culturilor de protoplaști ca modele experimentale ș.a.m.d.

În anul 1991 a luat ființă *Asociația Română de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale* (ARCTCV), asociație profesională, nonprofit, atestată juridic. La înființare, asociația avea 130 de membri. Până în anul 1995, asociația a editat o publicație proprie – Buletinul ARCTCV – cu apariție bianuală. Totodată, asociația s-a implicat direct în organizarea periodică a unor simpozioane naționale de culturi de țesuturi și celule vegetale, precum și în editarea și publicarea volumelor ce cuprindeau lucrările științifice (comunicările în plen sau în sesiune de postere) prezentate în astfel de ocazii. Scopul principal al acestei asociații a fost, și este, acela al realizării – la nivel național – a unei cât mai strânse legături între specialiștii din domeniul biotehnologiei vegetale, din țară, în vederea stimulării colaborărilor

între laboratoarele de profil din România, precum și facilitarea contactelor cu specialiștii din alte state. În lipsă de fonduri, buletinul asociației a avut un număr restrâns de apariții, neajuns compensat prin reușita publicării lucrărilor comunicate cu ocazia organizării simpozioanelor naționale de culturi de țesuturi și celule vegetale.

Participarea vitrocultorilor români la diferite manifestări științifice internaționale a crescut după anul 1990, intensificându-se contactele noastre cu specialiștii din Belgia, Germania, Olanda, Franța, Israel, Anglia, SUA, Ungaria, Republica Moldova, Bulgaria, Cehia, Slovacia, Suedia etc. S-au extins vizitele de documentare, de informare sau de specializare (de mai lungă sau mai scurtă durată), a vitrocultorilor vegetali din țara noastră, în străinătate, pe bază de burse, schimburi de experiență sau convenții de cooperare, stabilindu-se relații între laboratoarele și colectivele din universități sau din unitățile de cercetare din România, cu cele din alte state, prin programe Tempus, sau prin finanțare internă ori individuală. Totodată, s-au amenajat noi laboratoare de biotehnologie vegetală la Universitatea din Craiova, la Universitățile de Științe Agricole din București, Cluj-Napoca și Timișoara, la Universitățile "Babeș-Bolyai" din Cluj-Napoca și la cele din Oradea, Sibiu, Arad ("V. Goldiș") și Iași.

De la înființare, Asociația Română de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale (ARCTCV) s-a afiliat asociației internaționale de profil, respectiv la "International Association for Plant Tissue Culture & Biotechnology (IAPTC & B)", în al cărei evidență suntem cuprinși și în a cărei reviste de specialitate au fost publicate rapoarte sau lucrări informative, de către cercetătorii români. O parte dintre specialiștii români, din domeniul biotehnologiei vegetale, au participat cu comunicări științifice la congresele IAPTC (dintre aceștia menționăm pe *Cachiță*, *Pamfil*, *Palada*, *Roșu*, *Onisei*, *Gheorghiță*, *Toth*, *Zăpârțan*, *Cristea*, soții *Corneanu*, *Petrescu*, *Rakosy* și alții).

Cel de al "*V-lea Simpozion Național de Culturi de Celule și Țesuturi Vegetale*" a fost organizat la București, în anul 1993, de către: Academia Română, Societatea de Științe Biologice din România, Universitatea din București, Asociația Română de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale (ARCTCV), Fundația România de Mâine și Universitatea "Spiru Haret", ambele din București. Volumul conținând lucrările simpozionului a fost editat sub îngrijirea regretatului profesor universitar dr. *Ion Anghel*, coordonatorii volumului fiind *Anghel*, *Brezeanu* și *Cachiță*.

În anul 1994, în cadrul manifestărilor jubiliare "*Universitatea București, 1694 – 1994*", a fost organizat "*Simpozionul Național de Culturi de Celule și Țesuturi Vegetale*" intitulat: "*Proceeding of the National Sympo-*

sium of International Microbiology and Biotechnology", de către profesorul universitar dr. *Ion Anghel* şi colaboratorii. Cu acea ocazie, au fost prezentate şi publicate peste 80 de lucrări ştiinţifice, din domeniul culturilor de celule şi ţesuturi vegetale. Simpozionul a scos în evidenţă o amplificare a preocupărilor cercetătorilor din România, faţă de acest modern domeniu al biologiei vegetale.

Cel de al "*VI-lea Simpozion Naţional de Culturi de Celule şi Ţesuturi Vegetale*" a fost organizat la Băile Felix - Oradea, în vara anului 1996, de către ARCTCV, cu sprijinul Universităţii din Oradea şi al Universităţii de Vest "V. Goldiş", din Arad. Lucrările simpozionului au fost tipărite prin grija organizatorilor, sub conducerea editorială a profesorilor universitari: *Cachiţă*, *Ardelean* şi *Crăciun*.

Cel de al "*VII-lea Simpozion Naţional de Biotehnologie vegetală*" a fost organizat la Arad, în anul 1997, tot de către Asociaţia Română de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale (ARCTCV), împreună cu Universitatea de Vest "V. Goldiş" din Arad şi cu Universitatea din Oradea.

Următorul simpozion naţional de profil, cel de al VIII-lea, a avut loc la Buziaş, în vara anului 1998, organizat fiind de ARCTCV, împreună cu Universitatea Agricolă şi de Medicină Veterinară a Banatului, din Timişoara. Lucrările ştiinţifice comunicate la simpozioanele al VII-lea şi al VIII-lea de Culturi de Ţesuturi şi celule Vegetale, au fost reunite şi publicate într-un volum unic, sub coordonarea profesorilor universitari: *Cachiţă*, *Ardelean* şi *Crăciun*, volum intitulat: "*Culturi in vitro la cormofite*".

În vara anului 1999, la Constanţa, Universitatea "Ovidius" din localitate, împreună cu ARCTCV, au organizat cel de al "*IX-lea Simpozion Naţional de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale*", simpozion la care au fost prezentate peste 25 de referate, comunicări ştiinţifice şi postere, lucrări publicate de către Universitatea "Ovidius" din Constanţa, într-un volum tipărit în anul 2000, intitulat "*Actualităţi şi perspective în biotehnologia vegetală*" (editat sub îngrijirea profesorilor universitari *Cachiţă*, *Bavaru*, în colaborare cu cercet. şt. pr.I dr. *Brezeanu*), manifestare naţională la care s-a remarcat participarea cu lucrări ştiinţifice a multor tineri cercetători şi cadre didactice, din întreaga ţară.

În noiembrie 2000, la Universitatea "Babeş-Bolyai" din Cluj-Napoca, facultatea de Biologie, împreună cu Universitatea din Oradea şi cu ARCTCV, a fost organizat cel de al "*X-lea Simpozion Naţional, jubiliar, de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale*", intitulat: "**25 de ani de Culturi de Ţesuturi Vegetale în România**". La simpozion au fost prezentate 59 de lucrări, referate şi comunicări ştiinţifice, în plen sau postere. Lucrările simpozionului au văzut lumina tiparului în anul 2001, la Cluj-Napoca

(Editura Risoprint), prin grija editorilor coordonatori *Cachiță, Rakosy* și *Ardelean*.

Cel de al "*XI-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale*", din țara noastră, a avut loc – în anul 2002 – la Satu Mare (organizat de ARCTCV, cu sprijinul Universității de Vest "Vasile Goldiș" din Arad), manifestare omagială dedicată împlinirii a 100 de ani de la lansarea teoriei totipotențialității celulelor vegetale, și a inițierii de către *Haberlandt*, în anul 1902, a experimentelor, în această direcție, precum și a 50 de ani (1952) de la publicarea lucrării lui *Morel* și *Martin* cu privire la obținerea de vitroculturi de *datura* "libere de viroze", prin intermediul culturilor de meristeme, moment crucial în lansarea acestei proceduri ca metodă de mare viitor în biotehnologia vegetală, practicată ulterior în micropropagarea a numeroase specii de plante, în hortindustrii; volumul a fost publicat în anul 2003, la editura Daya din Satu Mare (organizatori și coordonatori ai volumului, profesorii *Cachiță* și *Ardelean*).

Eforturile întreprinse pe plan național, în direcția popularizării acestui nou domeniu al biologiei vegetale, au făcut ca biotehnologia vegetală din țara noastră să câștige noi și noi adepți, iar lumea biologică să se familiarizeze cu acest gen de literatură de specialitate. La cele arătate, trebuie să menționăm lucrările monografice și cărțile de popularizare publicate în decursul timpului, în țara noastră, în domeniul culturilor de țesuturi și celule vegetale, precum și cursurile universitare și postuniversitare, cu acest profil, editate în România. Astfel, în anul 1984 editura Ceres din București a tipărit prima monografie din domeniul vitroculturilor la plantele superioare, lucrare intitulată "*Culturi de celule și țesuturi vegetale – aplicații în agricultură*", autori: *Cachiță, Raicu și Badea*. Ulterior, în anul 1987, a văzut lumina tiparului, tot la editura Ceres din Bucureşti, o altă lucrare monografică, din domeniul culturilor de țesuturi și celule vegetale, intitulată "*Metode in vitro la plantele de cultură – baze teoretice și practice*", autor *Cachiță*, lucrare distinsă cu premiul "E. Teodorescu" al Academiei Române.

Între anii 1985-1986, la Institutul Agronomic "N.Bălcescu" din București, s-a organizat primul *curs* (postuniversitar) de biotehnologie vegetală, în scopul formării de specialiști (biologi și agronomi) în domeniul vitroculturilor vegetale, cu care ocazie s-a pus la dispoziția cursanților, încă din momentul inițierii orelor de curs (anul 1985), volumul intitulat "*Curs practic de culturi de țesuturi "in vitro", cu aplicații în legumicultură și floricultură*", autori: profesorii *Cachiță* și *Petrescu*. La acestea, se adaugă manualul "*Ingineria Genetică – note de curs*", publicat de Universitatea din București, în anul 1988, de profesorul *Anghel*, în calitate de coordonator al volumului.

Profesorul universitar dr.ing. *Petre Raicu* şi colaboratorii, într-o serie de cărţi cu profil de genetică sau de biotehnologie (publicate între anii 1986 şi 1990), au inserat capitole referitoare la tehnicile de cultivare *in vitro* a explantelor vegetale, cu tangenţă în genetică şi în ameliorare.

De asemenea, menţionăm şi publicarea de către colectivul *Raicu* şi *Badea* (1986) şi, separat, de *Ungureanu* (1990), a unor broşuri de popularizare a biotehnologiei vegetale, lucrări care au avut menirea să facă cunoscute, mai ales în rândul neiniţiaţilor, descoperirile din domeniul vitroculturilor vegetale, cu implicaţiile teoretice şi practice ale acestora în viaţa cotidiană.

Semnalăm şi apariţia în anul 1993 a primului manual românesc de biotehnologie generală editat de *Soran* şi colaboratorii, intitulat "*Elemente de biotehnologie*" lucrare în care se fac referiri şi la culturile de ţesuturi, celule şi protoplaste vegetale.

În domeniul învăţământului superior, axat pe biotehnologie vegetală, menţionăm şi publicarea – în anul 1993 – a volumului intitulat "*Curs de Biotehnologie – Culturi de ţesuturi in vitro, cu aplicaţii în horticultură*", autori, profesorii *Petrescu* şi *Cachiţă*, editat de către Academia Universităţii "Athenaeum" (Facultatea de Ştiinţe Horticole şi Bioinginerie, din Bucureşti).

În anul 1994, editura Ceres, din Bucureşti, a publicat volumul intitulat "*Înmulţirea vegetativă a arborilor forestieri. Metode convenţionale. Culturi de ţesuturi in vitro*", autori: *Enescu, Ioniţă* şi *Palada*. În această monografie, au fost detaliate cu precădere aspecte teoretice şi practice referitoare la înmulţirea vegetativă, naturală şi *in vitro*, a plantelor lemnoase.

O menţiune specială merită cursurile de vară organizate între anii 1995-1998 de către Facultatea de Biologie-Geologie a Universităţii "Babeş-Bolyai" din Cluj-Napoca, disciplina de Genetică (condusă de profesor universitar dr.*Nicolae Coman*), finanţate printr-un program TEMPUS şi PHARE, cu participare internaţională, privind implicaţiile genetice ale vitroculturilor, în general, şi ale culturilor de protoplaşti, în special, cursuri care s-au finalizat şi prin publicarea în anul 1998 a volumelor "*Utilizarea tehnicilor de electrofuziune în hibridarea somatică a plantelor*" şi "*Plant Genetic Engineering – Lab Manual*", în editura Universitară clujană, de către conferenţiar universitar dr. *Lenuţa Rákosy-Tican* .

În anul 1999, conferenţiar universitar dr. *Ana Roşu* (cadru didactic la Universitatea Agricolă din Bucureşti, facultatea de Biotehnologie), a publicat, la editura Ametist-92 din Bucureşti, monografia "*Elemente de biotehnologii vegetale, aplicaţii în ameliorare*", lucrare care se adresează, în principal, studenţilor şi specialiştilor din domeniul culturilor de ţesuturi şi celule

vegetale, dar şi celor interesaţi de genetică, inginerie genetică şi de ameliorare, la plante.

În anul 2000, *Cachiţă* şi *Sand* au publicat monografia intitulată: "*Biotehnologie Vegetală*" vol. I, lucrare adresată în special tinerilor care fac pregătire universitară, în acest domeniu.

În anul 2001, dr. *Elena Marcela Badea* împreună cu dr. *Daniela Săndulescu* (ambele cercet.şt.pr. I de la Institutul de Biologie al Academiei Române, din Bucureşti) au publicat, prin Fundaţia BIOTECH, monografia "*Biotehnologii vegetale*".

Informaţiile referitoare la publicaţiile din domeniul culturilor de ţesuturi şi celulelor vegetale nu ar fi complete dacă nu am menţiona şi faptul că o serie de articole de specialitate, axate pe problematica biotehnologiei vegetale, au fost publicate de către cercetătorii din România în reviste de profil din străinătate, sau în volumele editate cu ocazia diferitelor manifestări ştiinţifice, cu referire generală la biotehnologii, ori de genetică, ameliorare, de fito- şi ecofiziologie vegetală.

Iniţierea unui nucleu de cercetare axat pe problematica culturilor de ţesuturi şi celule vegetale, a fost una din dorinţele renumitului savant român academician prof. *Emil Pop* întemeietor al Institului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca, al cărui director a fost timp de mai mulţi ani.

Cu toate că, în ultimii ani, recesiunea economică din România a provocat un declin puternic al cercetării ştiinţifice, în general, implicit şi în domeniul culturilor de ţesuturi şi celule vegetale, în unităţile de învăţământ superior din Bucureşti, Cluj-Npoca, Timişoara, Iaşi, Oradea, Craiova, Bacău, Arad şi Sibiu, la *Banca de gene* din Suceava, laboratoarele de biotehnologie vegetală constituind unităţi în care studenţii biologi, agronomi şi silvicultori au practicat tehnicile moderne de vitrocultură, cu explante sau inoculi derivaţi din plante superioare, atât în scopul *micropropagării* (respectiv al multiplicării clonale a speciilor valoroase), cât şi al *modificării genetice*, dirijate, a unor specii vegetale, sau al *conservării* cormofitoinoculilor în *Bănci de gene*, astfel încât, treptat, această disciplină este prezentă în programele analitice ale unităţilor de învăţământ superior din ţara noastră.

Referinţele bibliografice se găsesc la pagina 228.

2. VITROCULTURILE VEGETALE ŞI TIPUL ACESTORA. PRINCIPII DE BAZĂ

Desprinderea organelor, ţesuturilor, a celulelor sau a protoplaştilor, dintr-un organism vegetal (tânăr sau adult), menţinerea lor în viaţă, în *vitrocultură*, *inducerea* şi *susţinerea* proceselor de *diviziune* şi de *regenerare*, subcultivarea timp îndelungat a acestora, cu *păstrarea* culturilor într-un anumit stadiu de organizare sau cu dirijarea după dorinţă a proceselor de morfogeneză, ori *conservarea* culturilor pe o durată nelimitată de timp, cu influenţarea sau nu a genomului lor ori, dimpotrivă, clonarea vitroinoculilor, constituie performanţe cu totul remarcabile ale biologiei vegetale moderne, activităţi care, per ansamblu, au primit denumirea de *biotehnologie vegetală*, sau de vitroculturi cu cormofitoinoculi. Reuşita cultivării şi a dirijării proceselor de creştere – la nivelul explantelor cultivate *in vitro* – ridică însă, uneori, probleme deosebite, întrucât celulele vegetale, "*extirpate*" fiind din organismul sau organul cărora le-au aparţinut (din complexitatea multiplelor *interconexiuni* şi *interrelaţii* care le asigura integrarea lor morfofuncţională, în structurile tisulare, de organe sau la nivel de organism, prin interdependenţe structurale şi funcţionale existente în mod obişnuit într-o fiinţă sau organ viu, integru), impune crearea *in vitro* a acelui cadru ecofiziologic care să permită celulelor respective, postinoculare, reluarea principalelor funcţii vitale. Cercetările au arătat că, în general, explantele *meristematice* prezintă cel mai ridicat grad de *autonomie morfofuncţională*, *in vitro* ele dovedind cea mai mare capacitate adaptativă şi regenerativă.

După detaşarea explantelor şi inocularea lor *in vitro*, acestea se constituie într-o unitate vie care deţine întreaga zestre genetică a plantei de la care ele au provenit, informaţie ce aparţine fiecărei celule vii şi care, în condiţii prielnice de mediu (chiar dacă celula devine independentă de locul ei de *origine*), poate să se exprime – total sau parţial – în funcţie de regimul ecofiziologic menţinut în vitrocultură.

O vitrocultură nu poate fi considerată ca fiind reuşită atunci când celulele sale supravieţuiesc, se multiplică şi inoculul *creşte*, ci numai dacă din cultura *in vitro* realizată, după un timp, pot fi operate *subculturi*. Altfel spus, după iniţierea vitroculturii – numită şi *cultură primară* – simpla menţinere în viaţă a inoculilor nu este o adevărată vitrocultură, ci doar dacă

aceasta poate fi perpetuată în timp, fie așa cum cultura a fost înființată (de exemplu, ca și o cultură de *calus* sau ca și o cultură de *celule*), fie trecându-se de la un anumit tip de cultură, respectiv de la o cultură de calus, la un alt tip de cultură, de exemplu la suspensii celulare, sau la generarea de embrioni somatici. Inițierea unei culturi secundare se face prin *repicare**, respectiv prin subcultivarea unei părți dintr-o cultură veche, pe un mediu proaspăt. Astfel, prin pasări repetate (operațiuni care constau în fragmentarea sau porționarea culturilor primare, ori a unor subculturi secundare, terțiare ș.a.m.d., de cormofitoinoculi și transferarea acestora pe medii proaspete), vitroculturile își păstrează calitatea vitală și capacitatea de diviziune, de regenerare, de organogeneză sau de embriogeneză, ori își redobândesc aceste aptitudini (în cazul în care celulele lor au intrat într-un blocaj fiziologic sau în senescență), în subcultură, adeseori impundu-se modificarea compoziției mediilor, în funcție de cerințe, pentru a putea fi dirijată evoluția cormofitoinoculilor spre morfogeneză, sau în sensul dorit.

Cu cât inoculul va avea o dimensiune mai mare, cu atât acesta va deține o mai ridicată rezervă de nutrienți și de fitohormoni, va suferi mai puțin în urma traumatizării și va avea șanse mai mari de supraviețuire. Inoculii mai mari necesită, însă, recipiente ceva mai înalte, și un volum sporit de mediu de cultură.

Vitroculturile la cormofite (*cormofitovitroculturile*) se realizează cu succes numai dacă sunt parcurse succesiv – fază cu fază – anumite *etape operaționale*, fapt care presupune, în primul rând, o temeinică informare a operatorilor cu privire la tehnica de lucru, dar și o bogată documentare de specialitate, impunându-se respectarea – treaptă cu treaptă – a recomandărilor din literatura de profil, în funcție de *materialul biologic* utilizat, de *tipul de cultură* ales, de *sezon* și de *scopul* urmărit. Aceste etape privesc parcurgerea anumitor proceduri, atunci când ne referim la operațiunile de *inițiere* (înființare) a unei vitroculturi, și a altor proceduri, atunci când în succesiunea etapelor operaționale urmează *subcultivarea* printr-o simplă repicare, sau trecerea de la o cultură de calus la o cultură de celule, ori de la o cultură de celule libere la o subcultură cu celule fixate pe anumite suporturi, sau de la o cultură de protoplaști la celule în suspensie, ori de la o suspensie de celule nediferențiate, la producerea de embrioni somatici, sau la etalarea suspensiilor celulare cu obținerea de microcalusuri ș.a.m.d. În toate cazurile, *natura* materialului biologic, *proveniența* lui în antecedență și regi-

* l. fr. repiquer – a răsădi, a înfige din nou

mul de cultură, grevează în final succesul sau insuccesul în realizarea tipului de vitrocultură dorit şi manipularea evoluţiei culturii, în sensul propus.

Calitatea şi evoluţia *vitrocormofitoculturilor* vor depinde nu numai de condiţiile *ecofiziologice* din *vitro* şi din camera de creştere, ci şi de *calitatea materialului biologic* inoculat, de *starea* fiziologică a *plantelor mame* sau a *organelor donatoare* de explante, ori a *vitroculturilor* care urmează să fie subcultivate (*mediile* de pe care provin, *vârsta* şi *tipul* culturii, *condiţiile* de cultură etc.). Capacitatea regenerativă, creşterea culturilor şi procesele de morfogeneză, postinoculare, depind foarte mult de: *viabilitatea* celulelor introduse în cultură, *vârsta* acestora, *gradul* de *diferenţiere* şi capacitatea lor de *multiplicare* şi de *creştere*, *procentul de celule* vii şi *totipotente*, aflate în cultură, din totalul celulelor care constituie cormofitoinoculul, *încărcătura genetică* a acestora, şi altele.

În *alegerea materialului biologic*, fie el plantă, organ, ţesut sau vitrocultură, atunci când dorim să iniţiem o cultură *in vitro* ori să operăm o subcultură, trebuie făcută cu multă atenţie, întrucât o multitudine de factori – în principal cei biologici – vor influenţa hotărâtor evoluţia inoculilor, atât în cultura primară, cât şi în subcultură. Astfel, în general, nu vor fi prelevate explante de la plante bolnave, decât în cazul în care se urmăreşte tocmai recoltarea de meristeme de la plante polivirusate (pentru iniţierea de culturi "*libere de viroze*"), ori de minibutaşi, calus, propaguli, sau protocormi, de la vitroculturi senescente, decât dacă se are în vedere o eventuală salvare a acestora, mai ales după o perioadă lungă de conservare a lor la temperatura laboratorului, ori în regim de hipotermie (la temperaturi pozitive, coborâte), sau la temperaturi negative extreme, cea mai obişnuită fiind aceea a azotului lichid (–196°C).

Succesul înfiinţării vitroculturilor va depinde, în primul rând, de respectarea tuturor *măsurilor de asepsie*, începând de la sterilizarea încăperilor şi a suprafeţelor, a recipientelor de cultură, a materialului vegetal – prealabil prelevării de explante – a apei şi a mediilor de cultură, precum şi de corectitudinea cu care sunt operate inoculările.

Metabolismul celulelor inoculate *in vitro* poate fi manipulat în limitele maleabilităţii lor adaptative, aptitudine moştenită genetic. Frecvent însă, în decursul vitroculturii, nu se pot exprima integral toate valenţele genomului, fie din cauza condiţiilor de cultură, fie a faptului că în urma producerii unor blocaje interne (manifeste la nivelul celulelor inoculate), exteriorizarea întregii totipotenţe a celulelor cormofitoinoculilor este limitată.

În mare, vitroculturile la cormofite privesc atât culturile de *celule* sau de *protoplaşti**, cât şi cele de *embrioni* (zigotici sau somatici), de *țesuturi*, de *organe* (de exemplu de antere, pistile, rădăcini, frunze etc.), sau de *fragmente de organe*, ori de *muguri*, *boboci*, *meristeme*, *calus*, *propaguli*, *protocormi* sau de alte tipuri de structuri organizate (fig. 2), cu grad variat de diferențiere morfofuncțională (de exemplu, cum este cazul de excepție al protalulului, la ferigi).

Modul de *clasificare al variatelor categorii* de **cormofitoinoculi** este diferit de la un autor la altul, factorul de departajare al tipului acestora depinzând atât de *criteriul* ales pentru selectarea materialului vegetal cultivat *in vitro*, cât şi de specificul culturii avută în vedere să fie realizată. Esențial este ca explantele, respectiv viitorii *cormofitoinoculii*, să conțină cât mai multe *celule vii* şi să nu dețină celule cu pereți celulari modificați secundar (suberificați, cerificați, cutinizați, mineralizați, lignificați), ori celule cu depozite de oxalați, sulfați sau carbonați, ori celule necrozate sau senescente. În general, este de preferat ca o parte dintre celulele care alcătuiesc inoculul să posede acumulări de amidon, sau de alte substanțe de rezervă. Explantele foliare, precum şi celulele sau protoplaştii individualizați din mezofilul foliar (în calitate de viitorii inoculi), vor fi mai viabile dacă vor fi recoltate de la *plantule* sau de la *plante tinere*, prealabil diferențierii profunde a pereților celulari ai acestora, întrucât prin înaintarea în vârstă a plantelor, în celule se produc modificări care transformă celulele juvenile în celule adulte şi chiar senescente.

Dacă se alege ca şi criteriu de departajare al inoculilor *dimensiunea* acestora, ei pot fi categorisiți în *macroscopici* (organe, propaguli, protocormi, explante tisulare, muguri, apexuri, embrioni, antere, ovule, fragmente de: rădăcini, frunze, tulpini, calus etc.), sau *microscopici* (agregate celulare, celule solitare, polen, saci embrionari, embrioni, meristeme şi protoplaşti).

În cazul în care ne referim la *tipul de cultură* care are în vedere *gradul de organizare* al celulelor, culturile pot fi *celulare* (chiar unicelulare) sau *tisulare*, cu țesuturi alcătuite din celule omogene (de exemplu, celule epidermale, calusale, cambiale, medulare, liberiene, mezofiliene etc.), ori

* Denumirea "culturi de protoplaşti", în limba română s-a impus, inițial, ca substantiv masculin, cu pluralul de "*protoplaşti*" (*Raicu* şi *Badea*, 1984; *Brezeanu* 1984; *Cachiță*, 1987; *Roşu*, 1999; Badea şi Săndulescu, 2001 ş.a.); *Soran* şi colab. (1993) şi, mai apoi, *Rakosy* (1998a) au utilizat pluralul de "*protoplaste*", cu toate că termenul de protoplast (protoplaşti) a intrat în limba română din limba franceză, ca substantiv masculin "le protoplast". În prezentul tratat, autorii utilizează atât pluralul masculin: *protoplaşti*, cât şi cel feminin, *protoplaste*.

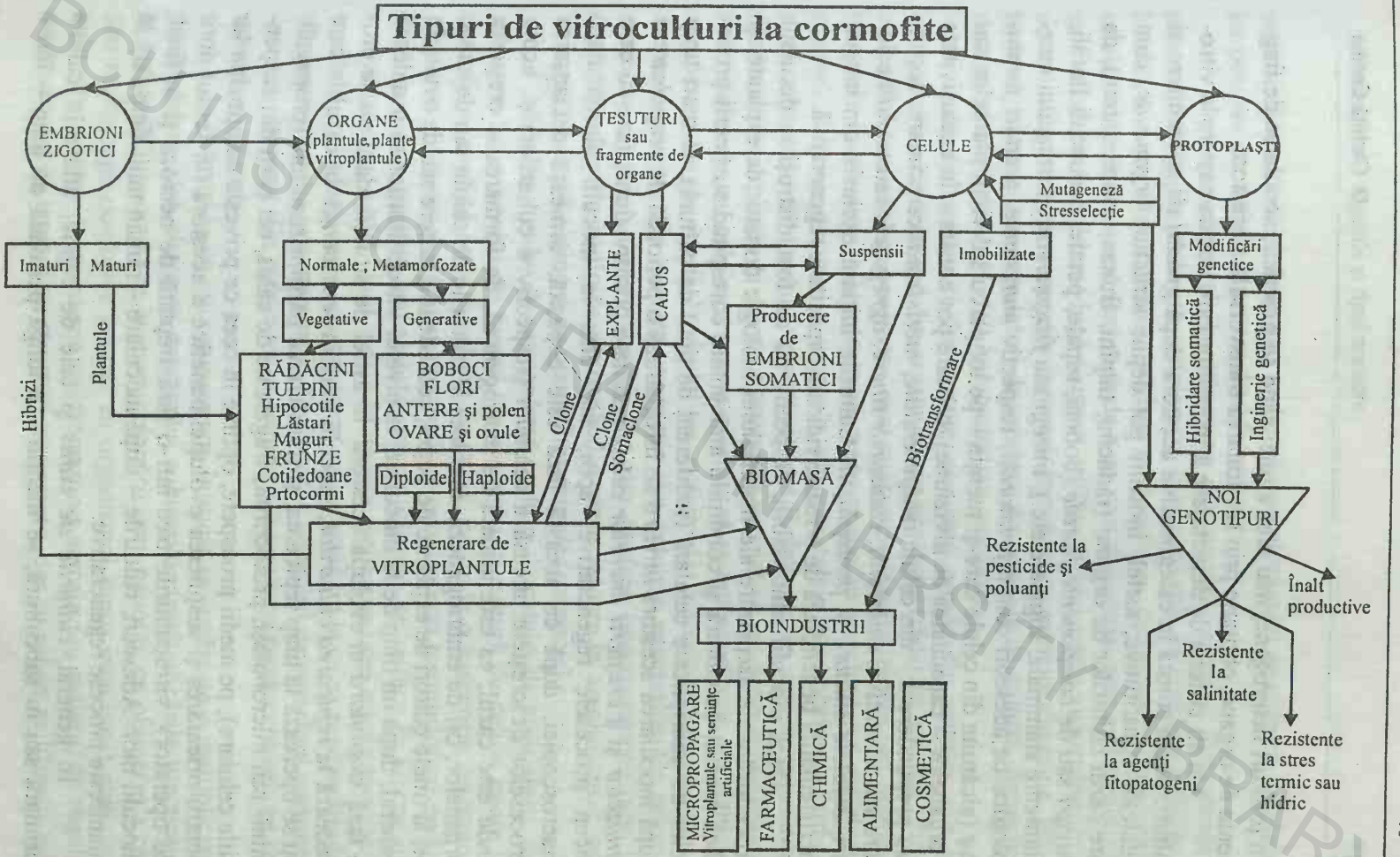


Fig. 2. Reprezentarea schematică, sintetică, a direcţiilor teoretice şi practice din domeniul vitroculturilor vegetale.

BCU IAŞI "OVIDIUS" UNIVERSITY LIBRARY

din țesuturi heterogene, mai ales atunci când se practică inocularea de fragmente de organe, obținute prin secționarea transversală a acestora.

Un alt criteriu de departajare a inoculilor care vor da naștere la vitroculturi, poate consta în categorisirea acestora după *gradul de diferențiere* al celulelor constitutive; astfel, inoculii pot deține structuri *organizate*, cum este cazul culturilor de *organe* (rădăcini, tulpini, frunze, ovare, antere), de *muguri* sau de *componente florale* (boboci, sepale, petale, pedunculi florali, filamente staminale, stigmate etc.), *întregi* sau *fragmentate*, formațiuni morfologice ce adeseori conțin *primordii*, respectiv *meristeme, țesuturi formative* (alcătuite din celule care-și mențin – pe tot parcursul vieții plantelor sau a organelor – capacitatea de diviziune), ori care pot consta – în exclusivitate sau preponderent – din celule *nediferențiate*, *meristematice* primare, secundare sau adventive, *embrionii*, *calusurile tinere*, *agregatele* sau *nodulii* celulari, *celulele solitare* și *protoplaștii*. Culturile inițiate exclusiv din inoculi meristematici beneficiază de o foarte ridicată capacitate regenerativă.

Dacă inoculii sunt viabili, respectiv nu au fost distruși în decursul procedurilor de asepsizare ale materialului biologic donator de explante, și dacă mediul de cultură și condițiile ambientale corespund susținerii proceselor de multiplicare celulară (indiferent de tipul de cultură), la scurt timp după inocularea acestora *in vitro* se înregistrază o perioadă de *propulsare a mitozelor* și a *creșterii tinerelor celule* rezultate postdiviziune, faze cu care încep procesele regenerative; apoi, mai ales la inoculii pluricelulari, macroscopici, după ce această fază este depășită, urmează declanșarea proceselor de creștere intensă a celulelor (respectiv a culturilor) și, acolo unde este cazul, ea este urmată de *morfogeneză*, de formarea și creșterea organelor, ori de embriogeneză, mai ales la culturile de celule sau de calus, ori la unele culturi de explante de pețiol, cotiledoane, antere sau de ovule. În general, după un timp de la inoculare, la nivelul vitroculturilor se instalează o fază *staționară* în evoluția acestora. În astfel de situații, dacă nu se procedează la *repicarea culturilor*, inoculii intră în *senescență*. În cazul în care nu se operează la timp repicarea, și transferarea părților rezultate (propaguli, mini- sau microbutași, protocormi, fragmente de calus, ori părți din suspensiile celulare), pe medii proaspete, optime în ceea ce privește compoziția lor pentru orientarea și susținerea evoluției benefice a acestora (în sensul dorit de operator), vitroculturile trec într-o fază treptată de necroză și în final, inoculii mor. Adeseori, culturile – după inoculare – rămân mult timp fără să manifeste procese regenerative.

În general, *culturile de calus* și cele de *celule*, aflate în cultura primară sau în subcultură, se mențin – o lungă perioadă de timp – într-o

stare *nediferenţiată* şi după mai multe zile ori săptămâni de cultură, celulele lor pot, sau nu, suferi un proces de diferenţiere.

Uneori, accidental, în culturi se pot petrece, aproape instantaneu, procese fiziologice nedorite, patologice, cum sunt cele de *vitrificare* (hiperhidrie) a cormofitoinoculilor, soldate cu pierderea definitivă a capacităţii celulelor atinse de acest fenomen de a se mai diferenţia, proces categorisit ca fiind de tip *neoplazic* (după *Gaspar*, 1998). Alteori, unele vitroculturi pot deveni independente, respectiv *autotrofe* în raport cu anumite vitamine, fitohormoni exogeni sau regulatori de creştere din mediile de cultură, fenomen denumit de *Gautheret* (1959) *habituaţie* sau *anergism*.

Inoculii constituiţi din organe, sau care provin din acestea, pot fi categorisiţi şi ca derivând din organe de tip *vegetativ* (rădăcini, tulpini, frunze ş.a.m.d.) sau de tip *generativ*, cum sunt ovarele şi staminele, ori bobocii (mugurii florali sau inflorescenţiali, care conţin în structura lor astfel de organe). Celulele, ţesuturile, organele, vitroplantulele sau embrionii (formaţiuni regenerate din inoculii vegetativi), pot fi *diploide*, în timp ce calusurile (derivate din explante prelevate din organe vegetative, ce deţin celule majoritare diploide), au celule ce pot cu uşurinţă să se *poliploidizeze*, iar plantele regenerate din ele vor fi, la rândul lor, poliploide. Vitroplantulele sau calusurile regenerate din *gameţii*, respectiv din celulele generative ale grăuncioarelor de polen (*microgameţi*), sau din *oosfere* (*macrogameţi*), vor fi *haploide*, plantele haploide prezentând o mare valoare în ameliorare, fiind utilizate în scopul obţinerii de plante *homozigote* (*izozigote*).

Alegerea *tipului de vitrocultură* (culturi de celule, de protoplaşti, de calus etc.) şi a tipului de *inocul* (de exemplu, o cultură de celule poate fi iniţiată fie pornind de la o cultură de calus, fie de la o suspensie de protoplaşti, ori de la un macerat celular realizat prin tratarea ţesuturilor cu pectinază, în dependenţă de materialul biologic utilizat), se va face în funcţie de *scopul* urmărit; astfel, dacă se are în vedere realizarea unei *micropropagări* rapide a unei specii sau a unui genotip, se va apela fie la calea regenerării de vitroplantule prin *organogeneză*, fie la calea generării de *embrioni somatici* (cel mai frecvent din culturi de suspensii celulare), cu producere sau nu de *seminţe artificiale*.

În industriile de micropropagare, întrucât se urmăreşte o multiplicare conservativă, fără alterarea genomului subiecţilor (multiplicările practicate în "cascadă" operându-se în scopul clonării unui genotip, cu obţinerea a cât mai multe copii *conforme genetic* cu organismul supus înmulţirii), iniţierea culturilor se face din explante *meristematice*, apicale sau axilare, de regulă caulinare, tip de inoculi cu structuri organizate, dar cu celule nediferenţiate,

prelevate de la plante mame donatoare, care au fost supuse, sau nu, prealabil recoltării meristemelor, unor proceduri de *termoterapie*. Astfel de inoculi, în *vitrocultură*, în decurs de aproximativ 6-10 săptămâni (funcție de *mărimea* explantelor meristematice, de specie sau de *cultivar*, ori de *condițiile de cultură*), vor genera vitroplantule, în marea lor majoritate "libere de viroze", atunci când explantele nu au fost mai mari de 1 mm. Ulterior, pentru micropropagare rapidă, din vitroplantule se vor dimensiona *mini-* sau *microbutași*, caulinari (de exemplu, la *Dianthus, Chrisanthemum* etc.) sau foliari (la *Saintpaulia*), care inoculați și cultivați *in vitro* vor regenera, în scurt timp, vitroplantule. La *Gerbera, Saintpaulia, Begonia, Nephrolepis, Drosera, Beta* ș.a.m.d., din variate fragmente de organe (ce conțin în structurile lor și celule meristematice), în vitrocultură, prin înmugurire, vor lua naștere minuscule colonii de plantule; acestea, ulterior, prin dezmembrare, permit individualizarea unor entități morfoanatomice ce se constituie în *propaguli* (înrădăcinați sau nu), formațiuni caracteristice vitroculturilor cu aspect morfologic de tufă. Propagulii pot fi desprinși dintr-o astfel de vitrocolonie și pot fi subcultivați. Aceștia sunt formați dintr-o zonă bazală, pe care se află inserate pețiolurile a 2-3 frunzulițe. Propagulii pot fi detașați și subcultivați *in vitro*, situație în care ei pot generea noi tufe de vitroplantule; propagulii înrădăcinați pot fi transferați *ex vitro* și aclimatizați, în timp ce, propagulii lipsiți de rizogeneză pot fi înrădăcinați, în condiții septice sau aseptice. Deci, procedurile de *micropropagare* constau într-o permanentă repicare, fragmentare a materialului biologic aflat în vitrocultură și subcultivarea acestuia *in vitro*, pe medii proaspete, operațiune repetată periodic, ritmic, la intervale scurte de timp (de circa una-două luni), în funcție de *specie*, de *viteza de creștere* a culturilor și de *condițiile de cultură*. Există și situații speciale, cum este cazul orhideelor, la care după inițierea proceselor regenerative, din inoculii meristematici iau naștere mici tuberculi verzi (de circa 3-5 mm), piriformi, numiți *protocormi*. Ei dețin o structură morfoanatomică particulară, care conferă acestor formațiuni un grad ridicat de autonomie funcțională. Fiecare protocorm, în circa una-două luni de la inoculare (mai ales în culturile submerse), prin înmugurire (înmulțire vegetativă) va da naștere la nenumărați noi protocormi, ce se constituie în asociații de protocormi (glomerule), fie glomerulele, fie protocormii solitari (separați din glomerul), fie fragmente protocormiale pot servi la operarea de subculturi și la micropropagarea orhideelor *in vitro*, tehnici practicate pe scară largă în industriile horticole.

Micropropagarea via *calus* nu este recomandată în multiplicarea clonală a unor genotipuri, deoarece celulele calusale suferind cu ușurință poli-

ploidizări, de cele mai multe ori vitroplantulele regenerate din calus nu sunt conforme cu genotipul de la care s-a plecat. Această procedură reprezintă o sursă de *variabilitate*, particularitate exploatată de amelioratori, pentru selectarea de *somaclone*. *Culturile de calus* pot servi însă şi altor scopuri, de exemplu pentru obţinerea de *biomasă*, valorificabilă în producerea de preparate *fitoterapeutice*. Astfel, pulberea de *Ginseng*, în multe cazuri, reprezintă un liofilizat de biomasă calusulă produsă *in vitro*, procedura care se constituie într-o metodă rapidă şi sigură de preparare a acestui fitoprodus, în comparaţie cu aceea care valorifică rizomii crescuţi în natură, metodă care presupune o cultivare de lungă durată a plantelor, în teren; în plus, valorificarea în fitofarmacie a unei biomase calusale permite obţinerea de biopreparate axenice, fapt care nu este de neglijat atunci când avem în vedere terapia cu biopreparate. Culturile de *calus*, pe de altă parte, pot servi şi la obţinerea de *suspensii celulare*, fie direct, fie indirect, din protoplaştii, care regenerându-şi peretele celular formează celule integre. Printr-o *etalare in vitro* a suspensiilor celulare aseptice, pe plăci agarizate, unele celule se individualizează şi, la locul lor de fixare, acestea se multiplică repetat, generând microcalusuri, din ele existând posibilitatea regenerării de vitroplantule, ce se cheamă că sunt derivate din linii celulare. Totodată, prin etalarea unor suspensii celulare – rezultate dintr-o cultură de protoplaşti, care au suferit o hibridare somatică (obţinuţi prin fuziuni de protoplaşti) - pot fi izolate şi regenerate noi genotipuri.

Culturile de celule solitare, aflate într-o suspensie omogenă, într-un mediu de cultură lichid, pot servi şi ca mijloc de obţinere a *embrionilor somatici*, iar din aceştia de *seminţe artificiale*. Dar, culturile de celule sau de embrioni somatici se pot constitui şi în *biomasă*, utilizabilă ca materie primă în industria fitofarmaceutică, pentru extragerea de produşi secundari de metabolism, biotehnologii vegetale de vârf în industria chimico-farmaceutică, modernă; dar, suspensiile de celule pot servi şi la obţinerea de culturi de *celule imobilizate* pe suporturi din materiale inerte, cum sunt: bureţii poliuretanici, sferulele poroase din porţelan sau din sticlă, tubuşoare etc., perfuzând cu mediul de cultură, cu suspensii celulare, coloanele umplute cu asemenea suporturi. Culturile de celule imobilizate pot servi, de asemenea, la obţinerea de variate *principii active*, utilizate în fitoindustriile de profil farmaceutic.

Atunci când se are în vedere obţinerea de *plante haploide*, prin culturi *in vitro* de *antere* sau de *polen* (*androgeneză*), ori de *ovule* sau de *saci embrionari* (*ginogeneză*), momentul prelevării gametofiţilor sau a gameţilor este decisiv în atingerea scopului propus, respectiv obţinerea – cu o

frecvență ridicată – de *vitroplantule haploide*. Este evident faptul că, în asemenea situații, *fenofaza* (stadiul de dezvoltare ontogenetică a plantelor mame) şi compoziția chimică a mediului de cultură (în special componența balanței hormonale), pot juca un rol hotărâtor în randamentul obținerii de haploizi, din totalul vitroplantulelor regenerate la nivelul acestor tipuri de inoculi. Dar, randamentul metodei (înțelegând prin randament procentul de plantule haploide regenerate dintr-un anumit explant), în astfel de culturi, va depinde – într-o foarte mare măsură – şi de specie, de "vârsta" celulelor gametice, de capacitatea regenerativă a acestora, în raport cu aceea a celulelor somatice (aflate în cocultură), prezente fiind în organele sau în formațiunile purtătoare de gameți.

Culturile de *protoplaşti* servesc, în principal, cercetărilor cu caracter teoretic, ca obiect de studiu în experimente de inginerie genetică şi de ameliorare, protoplaştii fiind utilizați ca "subiecți" în operațiunile care vizează obținerea de noi *genotipuri*, sau în efectuarea de cercetări cu caracter fundamental, de biologie celulară şi moleculară, în transferul de organite, în experimente cu vectori plasmidali sau liposomali, şi nu numai.

Culturile de *embrioni zigotici* sunt utilizate mai ales în studiile de *ameliorare*, în scopul salvării embrionilor neviabili (embrioni rezultați în urma încrucişării unor parteneri incompatibili genetic), situație în care embrionii avortează, iar semințele rezultate sunt sterile. Astfel de embrioni, recoltați într-un stadiu fiziologic propice (când aceştia dețin un grad satisfăcător de viabilitate, care să le permită continuarea dezvoltării lor normale, în condițiile inoculării acestora pe medii aseptice), cultivați *in vitro* prezintă o creştere bună, germinează şi dau naştere la plantule, care transferate *ex vitro* şi aclimatizate la condițiile de viață din mediul natural, dau naştere la hibrizi care, altfel, pe căi convenționale de ameliorare, nu ar putea fi obținuți. Ulterior, genotipul respectiv poate fi clonat prin multiplicare *in vitro*.

Adeseori, însă, cel mai important *obiectiv* al unor vitroculturi – indiferent de tipul de inocul utilizat – poate fi acela care să constituie un *model* experimental în studiile cu caracter fundamental, din domenii ca: fitocitologie, morfologie, anatomie şi fiziologie experimentală, în genetica şi în ameliorarea plantelor (prin metode netradiționale) şi altele, subiecte care vor constitui obiectul altor capitole cuprinse în prezenta monografie.

Analiza reactivității, respectiv a *comportamentului* diferitelor *tipuri de cormofitoinoculi*, în vitrocultură primară sau în subcultură (de mai scurtă sau mai lungă durată), trebuie să fie făcută în funcție de mai mulți parametri, cel mai adesea experimentele fiind *polifactoriale*. Pentru aceasta, în primul

rând trebuie definiţi termenii de **natură** şi **origine** a materialului vegetal utilizat ca inocul. Definirea acestor termeni nu este simplă, întrucât aceste noţiuni îmbracă diferite înţelesuri, în funcţie de cadrul de referinţă căruia viitorii inoculi se circumscriu, în dependenţă de *tipul* experimentelor în care aceştia sunt utilizaţi. Astfel, prin **natură**, în *sens larg*, se poate subînţelege, în general (potrivit "Dicţionarului enciclopedic al limbii române", Ed. Academiei Române, 1962-1966)(vezi *Cachiţă*, 1991), următoarele:

- lumea materială, universul, sau totalitatea fiinţelor şi a lucrurilor din univers;
- realitatea din mediul înconjurător, neinfluenţat de om;
- principiul considerat ca forţa care acţionează prin opoziţie cu creaţia umană;
- ansamblul legilor după care se conduce universul;
- *în sens biologic*:
- ansamblul atributelor unei fiinţe sau ale unui corp;
- stadiul primitiv sub care se prezintă o fiinţă sau un lucru;
- ansamblul caracterelor şi al proprietăţilor care definesc o fiinţă sau un lucru;
- ansamblul comportamentelor şi al instinctelor unui individ;
- personalitatea însăşi;
- ansamblul însuşirilor pe care le are o fiinţă din naştere, rezultate din conformaţia sa, şi care o caracterizează, constituind esenţa ei, modul propriu de a fi. Altfel spus, *natura* reprezintă totalitatea caracterelor specifice ale unui organism, care îl definesc şi care îl caracterizează ca trăsături şi particularităţi esenţiale (calitate, constituţie, funcţionalitate ş.a.m.d.) şi care, în ultimă instanţă, se pot traduce – la un moment dat – printr-o reactivitate cu un grad mai mare sau mai mic de specificitate.

În *biologie*, termenul de natură poate fi extins, ca plajă de definire, cu raportare şi la: *sistem*, *specie*, *explant*, *organ* sau *organit*, compuşi *moleculari* etc. Astfel, *natura sistemelor bilogice* semnifică, în primul rând, ceea ce caracterizează şi defineşte sistemul, ca *alcătuire* şi *funcţionalitate*, rezultat al activităţii subsistemelor care constituie sistemul, dar nu prin însumarea acestora, ci prin *interconectarea* şi *corelarea* entităţilor care-l compun.

În sens de *caracter*, natura poate fi definită ca proprietate, calitate, structură, varietate (lucru sau corp de o natură sau alta), compexitate, particularităţi funcţionale, dispoziţie etc.

Natura unei *specii* este termenul care circumscrie totalitatea caracteristicilor morfologice, anatomice, fiziologice, biochimice şi biofizice, respectiv a corelaţiilor existente la nivel molecular sau de ansambluri molecu-

lare (aflate în funcțiune sau într-o stare de inactivitate), totul găsindu-se sub incidența directă a informației ereditare, specifice. Natura unei specii, însă, se confundă cu *ereditatea*. Aceasta se interpune și se află corelată și influențată de sistemul creat, atunci când ne referim la genofond, la fondul genetic al unie populații de specii în care se află integrat organismul.

În cazul unui *biosistem*, natura poate fi definită ca totalitatea caracteristicilor și particularităților esențiale, indinspensabile asigurării existenței unui sistem viu, având un anumit grad de complexitate structurală.

Natura unui *explant* – organ, țesut, celulă ori protoplast – este sintagma care definește totalitatea caracteristicilor structurale, morfoanatomice și funcționale (fiziologice, biochimice și biofizice), generate și coordonate de informația genetică intrinsecă fiecărei celule vii (nucleată sau enucleată), manifestată sau nu pe parcursul dezvoltării, ori cu potențialitate de exprimare, aceasta putând fi mascată (blocată în substructuri), până în momentul în care se crează cadrul ambiental propice exprimării ei, sub acțiunea declanșatoare și susținătoare a stimulilor, explantul aflându-se în condiții optime, de origine *endogenă* sau *exogenă*, care permit revelarea acestei aptitudini.

Definițiile referitoare la **origine** se suprapun, într-o oarecare măsură (funcție de *sistemul de referință* ales, respectiv de contextul faptic), acelora de *natură*. Astfel, prin *origine* se subînțelege punctul de plecare (de exemplu, al nașterii unei ființe), început ori cauza lucrurilor și fenomenelor, sursă, familie, rasă, proveniență, apartenență (prin geneză) la o specie, grup, sușă etc.

În *biologie*, prin *originea* unei specii se subînțelege grupul de vietuitoare, sau populațiile din care a luat naștere o specie, apartenență sau neapartenență dedusă din analize privind asemănări ori deosebiri de ordin morfologic, anatomic, fiziologic, biochimic, biofizic și ecologic, ale unei specii, în raport cu alte specii, mai mult sau mai puțin înrudite filogenetic.

Originea unui *biosistem* este grupul sau mulțimea de elemente din care s-a format (descinde) biosistemul, ceea ce presupune și existența unor informații genetice.

Originea unui *explant* (țesut sau celulă), poate fi definită fie ca descendență ori *proveniență* dintr-un *organism* (*genotip* sau *fenotip*), aparținător unei anumite specii, varietăți ori ecosistem natural, fie ca derivată dintr-o vitrocultură (minibutaș, propagul, protocorm, ori alte categorii de părți dintr-o cultură, sau din fragmente de organe).

Originea unei *vitroculturi* semnifică atât *tipul de inocul* care a servit la iniţierea unei culturi, cât şi *proveniența* acesteia, în condiţiile operării de subculturi.

Dacă noţiunea de *natură* exprimă mai mult *convergența* sau *divergența* (deosebirile) dintre subiecţi (în ceea ce priveşte conţinutul şi cantitatea), *originea* se referă la *evoluţie*, la *dinamică* şi la *calitate*.

Proprietăţile inoculilor, funcţie de *natura* şi *originea* explantelor, se constituie în "filtre biologice" care "traduc", într-un anumit mod, specific, excitaţiile venite din mediul ambiant, iar celulele inoculate – prin totipotenţialitatea pe care o deţin – exteriorizează, sau nu, într-un interval mai lung sau mai scurt de timp, reacţia lor, în dependenţă de organismul din care provin acestea şi de nivelele sale de organizare.

Pe scurt, schematic, cele definite până acum pot fi sintetizate astfel:

NATURA	ORIGINEA
- însuşiri din *naştere*; - legi de *funcţionare* (creştere, dezvoltare, manifestare a competenţei totipotente etc.); - *caractere specifice*, proprietăţi ori trăsături particulare (individuale sau ale unui sistem); - *esenţă, calitate*; - *constituţie* (mod); - *conformaţie caracteristică*; - dispoziţii şi *disponibilităţi naturale*, ca rezultat al însuşirilor etc.	- început, *naştere*, *sursă*, izvor, punct de plecare al unei fiinţe sau fenomen; - *cauza* lucrurilor sau a fenomenelor; - *apartenenţa*, prin *geneză*, la familie, specie, soi; - *proveniență* (de exemplu o celulă provine dintr-o celulă similară din *vivo*, sau dintr-o celulă aflată în vitrocultură); origine a explantului, ce impune precizarea speciei, a cultivarului, a clonei, a organului sau ţesutului din care a derivat, din *vivo* sau din *vitro*, a câtea subcultură este etc.

Deci, prin *natura* şi *originea explantelor* – la baza cărora se află *ereditatea* – se subînţeleg nenumărate aspecte, fiecare dintre acestea fiind privite şi analizate de către diferiţii autori, din variate unghiuri de vedere, ceea ce conduce, adeseori, la interpretări diverse. În lipsa existenţei unei explicite terminologii de specialitate (adoptate cu rigurozitate ştiinţifică de către fiecare cercetător, în parte), dar şi din cauza marii diversităţi a materialelor vegetale cu care se lucrează, în condiţii experimentale extrem de variate, se poate realiza cu dificultate o coroborare a rezultatelor experimentale, pentru a se ajunge la o convergenţă a diferitelor puncte de vedere ale autorilor. Aşa se explică lipsa de consens în cazul analizării multor aspecte apărute accidental, la nivelul unor vitroculturi, de exemplu a vitrificării sau a habituaţiei unor cormofitoinoculi.

Atât *natura*, cât şi *originea* explantelor, respectiv a inoculilor – înţelegând prin origine fie proveniența *filogenetică*, fie *locul* din care au fost prelevate celulele sau ţesuturile care, la rândul lor, pot deriva din cadrul natural de viaţă, sau pot fi minibutaşii ori propagulii, dimensionaţi din vitro-

plantule, ori calus, celule sau protoplaşti, proveniți dintr-o vitrocultură – îşi pun amprenta, în mod diferit, asupra evoluției prezente şi viitoare a vitroculturilor, acestea jucând, adeseori, un rol hotărâtor în reacția cormofitoinoculilor cultivați pe medii cu o compoziție chimică particulară, incubați şi crescuți în condiții ambientale controlate.

Pentru studierea comportamentului *in vitro* a variatelor categorii de cormofitoinoculi, încă din perioada de pionierat a cercetărilor din domeniul culturilor de țesuturi şi celule vegetale, s-au făcut studii teoretice aprofundate privind *cinetica proceselor regenerative* şi a celor morfofiziologice şi biochimice, *in situ* şi *in vitro*, cel mai adesea pe *modelele* experimentale cele mai reactive, cum sunt explantele prelevate de la plante de tutun, andive, cartof, orhidee etc. Apoi, aceleaşi tipuri de experimente au fost reluate cu explante similare ca şi origine, dar recoltate de la diferiți alți indivizi, aparținători unei aceleiaşi specii, urmărindu-se – de această dată – în condiții identice, evoluția vitroculturilor în funcție de particularitățile de cultură. Pe de altă parte, s-au făcut studii comparative în direcția analizării *interrelațiilor* morfogenetice existente între organele unei plante şi între celulele unui țesut, precum şi consecințele prezenței sau a absenței acestora, ori studii referitoare la modul în care – în regim de vitrocultură – poate fi substituită, prin factori ambientali, de natură *fizică* sau *chimică*, întreruperea unora dintre corelațiile şi mesajele *biochimice* de care au dispus acestea *in situ*, respectiv a semnalelor pe care celulele le primeau de la anumite organe (la un moment dat al dezvoltării lor stadiale), atunci când ele se aflau la locul lor de origine, precum şi măsura în care acestea pot fi *suplinite* prin introducerea în substratul de cultură a unor fitohormoni sau regulatori de creştere (care ar putea fi aceştia, în ce concentrații şi în care amestecuri), momentul optim de utilizare a lor ş.a.m.d. O anumită situație trebuie analizată şi interpretată în dependență de toți factorii *endogeni* şi *exogeni* care intervin la nivelul vitroculturilor, la un moment dat, cum ar fi, de exemplu, desfăşurarea şi evoluția proceselor de *morfogeneză* (embriogeneză sau organogeneză), ori stoparea acestora. În cazul vitroculturilor, nu trebuie scăpat din vedere faptul că se operează cu părți dintr-o plantă sau dintr-un organ, fragmente care, odată ce au fost desprinse dintr-un sistem complex, inoculate fiind *in vitro* (având celule mai mult sau mai puțin traumatizate şi şocate din cauza suprimării legăturilor care asigurau echilibrul lor intern, prin *endoreglare*) ele, în calitate de inoculi, trebuie să devină *autonome* funcțional şi că, pentru regenerare, acestea trebuie să fie, în primul rând, viabile şi apte de înmulțire şi, mai apoi, capabile de diferențiere, stări morfofiziologice pe care celulele adulte – aflate la nivelul inoculilor – le-au

depăşit demult, în cursul dezvoltării ontogenetice a plantelor, respectiv a organelor, ţesuturilor şi celulelor cărora acestea le-au aparţinut.

După inoculare, fenomenele regenerative şi cele de morfogeneză sunt precedate de *naşterea unor procese de auto- şi endoreglare*, conforme cu cerinţele celulelor inoculilor, cu tipul acestora şi cu gradul lor de diferenţiere, care să permită noului sistem autonom creat, să supravieţuiască în vitrocultură, într-un anumit regim ecofiziologic artificial. Astfel, adeseori, cel puţin o parte dintre celulele inoculilor trebuie să se *dediferenţieze*, să redevină meristeme, să se multiplice, iar celulele rezultate din multiplicare să fie capabile de diferenţiere şi de morfogeneză, în condiţiile de mediu prezente în recipientele de cultură şi în mediul extern, în zona ambientală a acestora. În caz contrar, ioculii vor sfârşi prin a muri. Studii comparative efectuate în această direcţie, precum şi adoptarea unor modele experimentale care să asigure date concludente, reproductibile (calitativ şi cantitativ), în condiţii strict determinate, au adus elemente faptice care s-au dovedit a fi indispensabile în interpretarea *mecanismelor* de *citodiferenţiere*, de *histo-* şi *morfogeneză*, *în vitrocultură*, fapte care au permis înţelegerea mai profundă a proceselor de *organogeneză* şi de *embriogeneză*, dar şi a celor de *vitro-ontogeneză*, ce se petrec la nivelul variatelor tipuri de explante, cultivate *in vitro* în anumite condiţii experimentale. Fără îndoială că, în coroborarea rezultatelor diferitelor experimente este necesar să se stabilească, în primul rând, cu cea mai mare exactitate, *proveniența* materialului biologic, respectiv *sursa* acestuia, nu numai ca specie, organ şi stadiu de dezvoltare fazială a plantelor mame (ori a culturilor, în caz de subcultură), dar şi proveniența cormofitoinoculilor ca *amplasament* avut de celule sau ţesuturi în organe, în coroană, în inflorescenţă etc., respectiv *poziția* geometrică ocupată de acestea în corpul plantelor sau, în cazul unor inoculi derivaţi din vitroculturi, *etapele* parcurse de cultura respectivă în antecedenţă, la al câtelea pasaj se află cultura repicată şi în ce condiţii ş.a.m.d. Evident că, menţionarea cu exactitate a condiţiilor de cultură serveşte la elucidarea unor probleme referitoare la factorii care influenţează morfogeneza, mai ales în studiile de morfogeneză experimentală. De capacitatea de intuiţie a fiecărui experimentator, şi de fantezia cercetătorului, va depinde nu numai ingeniozitatea experimentelor întreprinse, dar şi valorificarea rezultatelor înregistrate până la acea dată, pe plan internaţional, coroborate cu datele obţinute în propriile experimente, rezultate care în ansamblul lor pot, sau nu, să conducă la rezolvarea unor dileme care se mai află în faţa operatorilor sau a cercetătorilor care lucrează în domeniul respectiv, de exemplu în direcţia micropropagării clonale a diferitelor specii sau subiecţi, date extrapolabile, sau nu, la alte

varietăți ori tipuri de vitroculturi. Subliniem faptul că, nici până la această dată nu sunt pe deplin cunoscute bazele moleculare ale interacției fitohormonilor cu restul sistemelor morfofiziologice. Manipulările curente, care se practică actualmente în inducerea și susținerea morfogenezei, au ca bază teoretică și practică conceptul de *balanță hormonală*, în special raportul auxină/citochinină, propus – încă în anul 1957 – de către *Skoog* și *Miller*. Nenumăratele experimente desfășurate până în prezent au dovedit că simplificarea proceselor biochimice, în decursul etapelor de organogeneză, numai la balanță hormonală auxino-citochininică, este nesatisfăcătoare. Toate cele arătate dovedesc, odată în plus, complexitatea aspectelor care se află în fața cercetătorilor sau a operatorilor care lucrează în domeniul vitroculturilor având ca obiect de cultură cormofitoinoculi.

Experimentele efectuate în scopul dovedirii *totipotențialității* celulelor vegetale au dat un nou impuls cercetărilor de **fitofiziologie**, respectiv investigațiilor referitoare la studierea comportamentului *variatelor tipuri de explante*, cultivate în *diferite condiții* experimentale, urmărindu-se *reacțiile* cormofitoinoculilor (de *proveniențe* și *dimensiuni* variate), în funcție de *compoziția chimică a mediilor* de cultură (compuși anorganici și organici, de natură și concentrații diferite, administrați singuri sau în amestec), de *regimul termic*, *hidric* și *gazos*, ori a celui de *iluminare*, analizele vizând aspectele citologice, anatomice, fiziologice și biochimice, observate la nivelul vitroculturilor și, eventual, modificările intervenite la nivelul mediilor de cultură.

După lansarea teoriei lui *Haberlandt* (1902), a urmat o diversificare a cercetărilor de fiziologie vegetală, acestea axându-se, în principal, pe aspectele de *nutriție*, *creștere*, *dezvoltare* și de *metabolism*, iar în domeniul vitroculturilor cu cormofitoinoculi, obiectivele cercetărilor fundamentale concentrându-se pe problema testării acțiunii diferitelor elemente și compuși chimici (*anorganici* și *organici*), ori a extractelor vegetale, a cărbunelui activ etc., asupra evoluției materialului biologic aflat în vitrocultură, ori a eficienței variaților agenți asepsizanți (în funcție de concentrația acestora, a *naturii* și *originii* explantelor, a *sezonului* de prelevare a materialului biologic etc.), sau pe aspecte referitoare la păstrarea viabilității inoculilor și a capacității lor *regenerative*, a *creșterii* acestora, postinoculare. Astfel, pornind de la analiza reacției cormofitoinoculilor, în funcție de *natura* și *concentrația compușilor* și a *ionilor* prezenți în mediile de cultură, de *tipul* inoculului, dar și în dependență de *mărimea* acestuia, în epoca cercetărilor de pionierat au fost întreprinse numeroase studii privind evoluția inoculilor în *cultura primară* și în *subcultură*. În acest mod, s-a putut constata că

extracte de proveniență diferită, adăugate mediilor de cultură, uneori au stimulat creşterea variatelor categorii de cormofitoinoculi. Încă în anul 1922, *Robbins* a dovedit faptul că, *extractul de drojdie* – în cultura de vârfuri de rădăcini de porumb – a stimulat creşterea acestora; *White*, în anul 1934 b, grație extractului de drojdie, adăugat în culturile de rădăcini izolate de tomate, a reuşit subcultivarea lor, pe o durată nelimitată de timp.

Laptele din nuca de cocos, respectiv albumenul lichid conținut în semințele acestei specii (complex de substanțe naturale), adăugat mediilor de cultură, la variate tipuri de cormofitoinoculi, a exercitat efecte favorabile asupra evoluției culturilor, stimulând creşterea embrionilor de *Datura* (după *Van Overbeek* şi colaboratorii, 1941), a explantelor tisulare de morcov (după *Caplin* şi *Steward*, 1948), a țesutului tumoral de crown-gall ş.a.m.d. Acest fenomen s-a datorat faptului că laptele din nuca de cocos conține, pe lângă prolină, acid glutamic, vitamine, biotină, şi citochinine, şi multe alte substanțe organice, compuşi de natură încă necunoscută.

Variate *extracte preparate* din *endosperm* de graminee (mai ales de porumb şi de orz), sau din diferite semințe, grație conținutului lor bogat în compuşi organici, complecşi (în principal vitamine, enzime şi citochinine), au fost utilizate cu succes, de-a lungul timpului, în vitrocultură (*Caplin* şi *Steward*, 1948; *Steward* şi *Caplin*, 1952; *Netien* şi *Beauchense*, 1953 etc.).

În epoca de pionierat, *modelele experimentale* au constat, preponderent, din țesut *cambial* de morcov, plop, salcie, sau din *măduvă* de tutun. Treptat, gama tipurilor de inoculi s-a lărgit mult, renunțându-se la explantele constând din țesuturi prelevate de la specii lemnoase (mai slab reactive) şi trecându-se la explante prelevate de la specii ierboase, aflate în variate fenofaze, sau chiar în stadiul de plantulă.

Dacă prin experimentele lui *Vöchting* (1878) şi cele ale lui *Rechinger* (1893) s-au adus precizări referitoare la "*limitele divizibilității*" plantelor sau a organelor, cu regenerarea de plante, din fragmente, prin metodele clasice de înmulțire vegetativă, precum şi cu privire la *competența* şi *calitatea actului regenerativ*, în funcție de *orientarea polară* a butaşilor în substratul de cultură, prin studiile de vitrocultură aceste cunoştințe s-au extins, realizându-se regenerarea de vitroplantule din inoculi de dimensiuni microscopice, din celule solitare sau chiar din protoplaşti, crescuți în regim aseptic. La macro-şi microexplante, respectând sau nu orientarea polară a acestora – în momentul inițierii vitroculturilor – s-a putut dovedi faptul că la multe categorii de inoculi – cum sunt meristemele caulinare (apicale sau axilare), ori fragmentele prelevate de la organe *cilindrice* (tulpini, peţioluri, pedunculi florali sau rahisuri), sau *conice* (muguri, boboci), ori cele cu o structură

dorsoventrală – corecta *orientare polară* a inoculilor, amplasați pe mediile de cultură solidificate, respectiv cu polul radicular (bazal) înfipt în interiorul mediului agarizat şi cu polul caulinar (apical) orientat în afara substratului de cultură, exercită, adeseori, o influență decisivă în creştere şi morfogeneză, în primul rând, grație aprovizionării celulelor cu apă, nutrienți şi cu fitohormoni; incorecta orientare polară a explantelor (mai ales a acelora macroscopice), în momentul amplasării lor în substratul de cultură solidificat, limitează capacitatea de supraviețuire a acestora, şi poate anula declanşarea unor procese regenerative normale, respectiv multiplicarea celulară, susținerea organogenezei, natura acesteia şi intensitatea fenomenelor de morfogeneză. Alteori, orientarea polară incorectă a fragmentelor microscopice, cum este cazul meristemelor apicale, caulinare, pe mediile de cultură agarizate, poate să nu pericliteze supraviețuirea acestora şi inițierea proceselor regenerative, dar, în astfel de situații, adeseori, organogeneza se produce haotic, muguraşii adventivi şi tulpinițele nou formate crescând în interiorul mediului gelificat, suferind de hipoxie, iar rădăcinițele – dacă se formează – se dezvoltă la polul opus, în atmosfera din recipientele de cultură, ceea ce împiedică o evoluție morfoanatomică normală a culturilor. Experimentele au permis şi demonstrarea faptului că, adeseori, explantele care au o puternică manifestare polară, prin amplasarea acestora cu lungul lor în poziție paralelă cu suprafața mediilor de cultură aseptice (semisolide sau solide), pot depăşi cu succes limitele provocate de circulația polară a o serie de "trasee" fiziologice (cum sunt cele legate de absorbția şi migrarea nutrienților, ori a fitohormonilor), în corpul plantelor mame procesele regenerative şi de organogeneză desfăşurându-se nestânjenite. Cu toate acestea, un anumit grad de polaritate – bazală şi apicală – se manifestă chiar şi la nivelul celulelor ce dau naştere la embrionii somatici, întrucât după diviziunea fiecărei celule, celulele rezultate vor prezenta, fiecare dintre ele, o manifestare morfogenă polară, dintre celulele nou formate unele generând celule ce se vor diferenția în țesuturi radiculare, iar altele dând naştere la țesuturi caulinare. Astfel de "diferențieri", petrecute în interiorul celulelor meristematice –cu tehnica actuală – nu pot fi decelate pe plan ultrastructural, biochimic, respectiv molecular. Pe de altă parte, circulația şi localizarea fitohormonilor, natura şi concentrația *endogenă* a acestora, "mesajele" chimice ce sunt transmise altor celule şi sunt, sau nu, "decodificate", la locul țintă, marcându-se, sau nu o reacție, mai mult sau mai puțin previzibilă, sunt fenomene care nu pot fi detectate calitativ şi cantitativ, cu toate că aceşti factori intervin, uneori, radical în evoluției cormofitoinoculilor, influențând nu numai procesele regenerative, ci şi cele de organogeneză şi de embriogeneză, amplasarea

acestora, inclusiv receptarea factorilor geotropici şi fototropici ce generează – în ansamblul lor – percepţii şi reacţii specifice, în interiorul celulelor ce urmează să crească şi să se diferenţieze. În urma acestor cercetări, vitrocultorii au stabilit – în linii mari – anumite reguli de orientare a inoculilor multicelulari, cormofitici (cu precădere în cazul minibutăşirilor), în substratul de cultură agarizat, pentru a se putea previziona obţinerea de rezultate scontate, cu precădere în operaţiunile de micropropagare, în producerea de material săditor de calitate, la intervale de timp bine stabilite, mai ales în unităţile biotehnologice de tip industrial, studiile teoretice, de această natură, reprezentând un bun exemplu de aplicare a rezultatelor cercetărilor fundamentale, în practica productivă.

În cazul cormofitoinoculilor cultivaţi în medii lichide, respectarea condiţiilor de polaritate devine caducă.

Într-o serie de experimente, ca material biologic s-au utilizat embrioni imaturi sau maturi (de preferinţă germinaţi), ori părţi din aceştia. Pentru prelevarea acestora, *germinarea semințelor* s-a făcut în condiţii aseptice. *Knudson*, încă între anii 1921-1922, studiind încolţirea semințelor în condiţii aseptice, a descoperit calea germinării asimbionte a semințelor de orhidee, pe medii artificiale de cultură, în lipsa fungilor din sol. Este bine cunoscută simbioza obligatorie dintre rădăcinile plantelor de orhidee şi anumite mucegaiuri din sol, micorizele asigurând aprovizionarea acestor minunate plante cu apă şi nutrienţi (descoperire făcută de *Bernard*, în anul 1899). La orhidee, simbioza este cu atât mai benefică şi indinspensabilă, cu cât embrionii semințelor lor – având dimensiuni extrem de mici (fiind pulverulenţi) – sunt lipsiţi de substanţe de rezervă şi de rădăcinițe (după *Pierik*, 1984). În cadrul natural, septic, această constituţie anatomică, particulară a embrionilor de orhidee face problematică supravieţuirea plantulelor, postgerminaţie, în absenţa din substrat a fungilor micorizali, specifici. În practicile floricole tradiţionale, compoziţia amestecurilor care alcătuiesc substratul optim de cultură a genurilor, speciilor şi a varietăţilor de orhidee, constituie secrete de familie, păstrate cu străşnicie, pentru a se evita concurenţa. În epoca modernă, intensificarea comerţului cu flori de orhidee i-a determinat pe cercetători să investigheze căile prin care pot fi înmulţite aceste preţioase şi frumoase plante, eforturi care au condus – în final – la elaborarea unor vitrotehnologii eficiente de micropropagare a lor *in vitro*.

Obţinerea de vitroplantule, prin germinarea în condiţii aseptice a semințelor, actualmente a devenit o practică curentă, în scopul prelevării, din embrioni sau din plantule, a variate categorii de explante (de tipul rădăcinițelor, hipocotilelor, cotiledoanelor, epicotilelor, mugurașilor, frunzulițelor

ş.a.m.d., întregi sau fragmentate), utilizate ulterior ca inoculi, respectiv ca modele experimentale, într-o serie de studii de *biotestare*, de exemplu în scopul analizării efectelor unor compuşi organici sau a unor regulatori de creştere, ori a unor extracte, ca adaosuri la mediile de cultură, urmărindu-se acţiunea lor cito- sau morfofiziologică. Uniformitatea unor astfel de explante asigură nu numai reproductibilitatea experimentelor şi obţinerea de rezultate cât mai edificatoare, dar şi un modern "instrument" posibil de utilizat în investigaţii variate şi în cercetări care au ca obiectiv studierea proceselor implicate în fiziologia creşterii, în organogeneză, în embriogeneză sau în metabolism, cu precădere în analizarea căilor şi a condiţiilor de sinteză a produşilor secundari de metabolism. Pe de altă parte, organe sau fragmente de organe, desprinse din plantule derivate din seminţe germinate în condiţii aseptice, au devenit material biologic standard în *iniţierea culturilor de calus* sau, la unele specii, pentru realizarea embriogenezei somatice, la nivelul cotiledoanelor ori a hipocotilelor (mai ales la gimnosperme), sau în scopul unei mai facile preparări a suspensiilor de protoplaşti, organele plantulelor nedeţinând modificări secundare ale pereţilor lor celulari, hidroliza lamelei mijlocii de pectat de calciu obţinându-se mai uşor prin tratament cu pectinază, iar a peretelui celular celulozic, cu celulază.

De-a lungul timpului, s-au făcut şi variate experimente, deosebit de interesante, cu caracter *fitopatologic*, în scopul examinării raporturilor care se stabilesc între un agent patogen şi ţesuturile sau celulele gazdă. Astfel de cercetări privesc studierea comportamentului *in vitro* a ţesuturilor afectate de atacul unor micoze, bacterioze, micoplasme sau virusuri, ori în prezenţa *toxinelor* emise de bacteriile sau de ciupercile fitopatogene, cercetări care au condus la abordarea unor obiective legate de obţinerea, prin vitrotehnici, a unor genotipuri rezistente la astfel de atacuri, fie prin proceduri de inginerie genetică, fie prin stresselecţie, de exemplu la acţiunea nocivă a unor fitotoxine.

Încă în anul 1910, *Jensen* a demonstrat faptul că, celule tumorale de sfeclă pot să se multiplice şi să crească în condiţiile *grefării* lor într-o plantă sănătoasă. Tumorile vegetale au natură şi proveniență variată. Unele, sunt de origine *genetică* (mai ales cele prezente la nivelul hibrizilor de *Nicotiana*), altele sunt de origine *virală* (la specii de *Rumex* şi *Melilotus*), unele sunt provocate de *insecte* (galele de pe frunzele de stejar), iar altele sunt cauzate de *bacterii*, cum sunt cele produse de *Agrobacterium tumefaciens*, bacterie care, la sfeclă, induce o stimulare a *hiperplaziei* celulare.

Culturile *in vitro* de explante prelevate din tumori vegetale s-au constituit în modele experimentale în studiile de *oncologie vegetală*; tot-

odată, ele au servit şi la investigarea factorilor responsabili de apariţia bolilor neoplazice, în descrierea caracteristicilor morfofiziologice şi metabolice ale acestor celule, precum şi a cercetării factorilor care influenţează evoluţia lor *in vitro*, şi în care direcţie. Această categorie de culturi sunt folosite şi în studierea *creşterii*, în regim de "*autonomie*", a celulelor sau a ţesuturilor neoplazice, explantate şi cultivate pe medii aseptice, de diferite compoziţii, modificările morfologice, citologice, ultrastructurale şi biochimice ce se produc în interiorul celulelor acestor culturi, aspectele observate fiind comparate cu modificările constatate în celulele normale, sau în celulele canceroase, animale sau umane.

White, singur sau în colaborare cu *Braun* (anii 1942-1944), a publicat o serie de lucrări legate de cancerul vegetal, precum şi cu privire la autonomia ţesutului tumoral de tip crown-gall, sau a ţesutului tumoral liber de infecţii virale sau bacteriene; ulterior, *Hildebrandt* şi *Riker*, cu sau fără *Duggar*, între anii 1945-1949, s-au făcut remarcaţi în literatura de specialitate prin cercetările lor referitoare la reacţiile *in vitro* ale *ţesuturilor şi celulelor tumorale*, utilizând această categorie de inoculi, ca modele experimentale.

Culturile fotoautotrofe au fost utilizate cu succes ca modele experimentale în studierea proceselor de fotosinteză, *Bergmann* (1967) fiind printre primii care a analizat desfăşurarea acestui fenomen la suspensiile celulare de *Nicotiana tabacum*. Abia după cea de a doua jumătatea a deceniului şapte al secolului trecut, s-au obţinut primele vitroculturi fotoautotrofe (*Berlyn* şi *Zelitch*, 1975; *Dalton* şi *Street*, 1977; *Hüsemann* şi *Barz*, 1977; *Yamada* şi *Sato*, 1987 etc.) şi au fost descrise avantajele acestei modalităţi de vitrocultură. *Fujiwara* şi colaboratorii (1988), pentru a cultiva în regim fotoautotrof ţesuturi vegetale, au conceput un sistem original care le-a permis multiplicarea căpşunului pe medii lipsite de zaharoză; pe de altă parte, pe medii fără glucide, *Kozai* şi *Lee* au micropropagat cartoful şi garoafele (din *Kozai*, 1991). Tot *Kozai* (1991 a şi b) a descris şi a utilizat un nou sistem de iluminare a vitroculturilor, care constă dintr-o reţea de fibre optice, normale, transparente, ce distribuie – în mod difuz, între flacoanele de cultură – lumina captată de la soare, fapt care a condus la reducerea substanţială a costurilor, în producerea materialului de plantat. Pentru cultivarea *in vitro*, în regim mixotrof sau heterotrof a 200.000 de explante, în micropropagare, în decurs de o lună, se consumă 60 kg zaharoză; în culturile fotoautotrofe zaharoza fiind eliminată din compoziţia mediilor de cultură, se creează o posibilitate în plus de reducere a costurilor de producere *in vitro* a materialului de plantat (*Kozai*, 1991c).

Un al treilea avantaj al culturilor fotoautotrofe rezidă în procentul mare de supraviețuire (de peste 95%) atins de vitroplantulele crescute în regim fotoautotrof, în perioada aclimatizării lor la mediul septic, vitroplantulele regenerate în regim heterotrof sau mixotrof, postaclimatizare, supraviețuind în procent de numai 20-50%, din cauza slabei lor capacități adaptative la condițiile stresante ale mediului septic și a instalării unei balanțe negative în ceea ce privește valorificarea CO_2, și așa prezent în cantități insuficiente în celulele mezofilului foliar, împiedicându-se – la astfel de plante – desfășurarea proceselor de fotosinteză la cote corespunzătoare satisfacerii cerințelor vitale ale acestora (după *Kozai*, 1991) (pentru mai multe detalii a se consulta volumul 2 al prezentului tratat, în curs de elaborare).

Din aspectele menționate a rezultat complexitatea fenomenelor care se pot afla în fața cercetătorului sau a operatorului care lucrează în domeniul culturilor vegetale *in vitro*, de *organe*, *țesuturi*, *celule* sau de *protoplaști*. În prezentul tratat, vor fi detaliate principalele aspecte referitoare la procesele care se petrec la nivelul vitroculturilor efectuate cu cormofitoinoculi aflați într-un regim ecofiziologic diferit, practicate în scopuri teoretice sau practice, variate.

Referințele bibliografice se găsesc la pagina 228.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. LABORATORUL DE BIOTEHNOLOGIE VEGETALĂ

3.1. INTRODUCERE

Vitrotehnicile au în comun faptul că vitroculturile se dezvoltă într-un regim artificial, *aseptic*, principala operațiune constând din *inocularea*, pe medii de cultură *sterile*, cu un instrumentar lipsit de germeni, a unor "subiecți" vii, de natură și proveniență variată.

O unitate profilată pe tehnici de *vitroculturi vegetale* are caracteristic faptul că activitatea de *pregătire* a materialului biologic, în vederea prelevării explantelor care urmează să fie inoculate, se desfășoară tot în condiții *aseptice*. Mediile de cultură, însă, au o înaltă notă de specificitate, ele diferind – ca și compoziție chimică – de cele utilizate în variate alte tipuri de vitroculturi, în primul rând prin aceea că au un conținutul ridicat în glucide (20-30 g/l zaharoză sau glucoză), ceea ce le face, în permanență, vulnerabile la infecții cu germeni saprofiți, de tip microbian sau fungic. În astfel de situații, germenii infestanți împiedică dezvoltarea cormofitoinoculilor, la scurt timp de la instalarea lor în mediile de cultură, producându-se moartea vitroculturilor de bază, chiar și după demararea proceselor regenerative. Acest impediment limitează și condiționează viața cormofitoinoculilor, din cauza modificărilor provocate la nivelul mediilor de cultură, a căror calitate este profund degradată, precum și a "sufocării" inoculilor vegetali de către microorganismele devenite concurente pentru un același substrat de cultură, într-un sistem ecofiziologic închis. În asemenea situații, se înregistrează mari *pierderi* de *material biologic* (unicat sau rarite), de *compuși chimici* (componenți ai mediilor de cultură, depreciate după infestarea lor cu microorganisme saprofite), precum și pierderi de *energie electrică*, consumată în procesul de autoclavare sau în camerele de creștere, ori în cele de termoterapie (în cazul tratamentelor aplicate viitoarelor plante mame, donatoare de meristeme – cu rol în stoparea infecțiilor virale la nivelul apexurilor caulinare, în celulele subiacente meristemelor – în tentativa de obținere de vitroculturi "libere de viroze"), dar și de *efort uman*. Ratarea operațiunilor de înființare a vitroculturilor aseptice înseamnă pierderea *muncii investite* în prepararea mediilor de cultură, spălarea sticlăriei, asepsizarea materialului biologic, prelevarea și inocularea explantelor, dar și în debarasarea și lava-

rea recipientelor de cultură infectate şi reluarea întregului ciclu de operaţiuni care se impun, pentru refacerea culturilor pierdute.

Din cele arătate, au rezultat pierderile provocate în cazul producerii de infecţii, la iniţierea vitroculturilor – infecţii *primare* – respectiv a acelora care se petrec în primele zile postinoculare; în vitrocultură pot interveni însă, accidental, şi infecţii *secundare*, în oricare moment, pe parcursul perioadei de incubare şi de creştere a culturilor. Cauza acestor infecţii este – de cele mai multe ori – de natură *exogenă*, fiind provocate fie de asepsizarea nesatisfăcătoare a materialului biologic, donator de explante, fie obturării deficitare a recipientelor de cultură, sau ca urmare a unei inadecvate sterilizări a sticlăriei, ori a autoclavării necorespunzătoare a flacoanelor cu medii. Înfecţiile secundare pot fi, uneori, şi de natură *endogenă*, ca urmare a răspândirii în mediile de cultură a unor germeni prezenţi în profunzimea structurilor interne ale cormofitoinoculilor, bacterii ori micoze localizate endo- sau intercelular.

Principalele aspecte care trebuie avute în vedere, pentru ca în laboratorul de culturi *in vitro* să nu intervină eşecuri lamentabile, privesc *calificarea* la un nivel corespunzător a fiecărei persoane implicate în verigile operaţionale, într-o asemenea unitate, în special a celor care manipulează materialul biologic, prepară şi asepsizează mediile de cultură şi inoculează. Atunci când se are în vedere extinderea la nivel industrial a unor practici care presupun executarea unor lanţuri operaţionale efectuate *in vitro*, *calitatea factorului uman* joacă un rol esenţial în randamentul muncii, ştiut fiind faptul că în vitrocultură prezenţa operatorilor este indispensabilă, iar mecanizarea sau robotizarea fluxului tehnologic, în micropropagare, este extrem de costisitoare. Astfel, calificarea şi dexteritatea operatorilor, viteza de lucru, disciplina şi corectitudinea acestora, reprezintă condiţii de bază pentru buna desfăşurare a activităţii în laboratoarele de vitrocultură, de calitatea muncii depinzând bilanţul economic şi randamentul obţinut (mai ales într-o unitate de producţie), eşecurile grevând asupra costurilor globale, ridicând preţul final al produsului rezultat la încheierea procesului biotehnologic.

Cu cât unitatea în care se practică vitroculturile vegetale este mai mare, cu atât personalul acesteia va fi mai numeros şi vor exista mai multe problemele legate de *planificarea* volumului de muncă, *necesarul* de materiale, *desfacerea* produselor biologice rezultate, sau *conservarea* acestora. Policalificarea personalului este binevenită, în cazul în care eventualele activităţi secundare nu afectează manualitatea şi puterea de concentrare a operatorilor. În cazul operaţiunilor de inoculare, *factorul uman* deţine rolul esenţial, întrucât nu numai rapiditatea cu care se execută fiecare inoculare

este importantă, ci şi acurateţea tehnică cu care se prelevează şi se inoculează explantele. Dimensionarea corectă a explantelor şi amplasarea corespunzătoare a lor în mediul de cultură – atât ca orientare polară, cât şi ca profunzime (afundarea prea adâncă a cormofitoinoculilor în substratul de cultură – semisolid sau solid – supune ţesuturile la condiţii anaerobe, ceea ce face ca celulele acestora să sfârşească prin a se necroza), condiţionează calitatea vitroculturilor obţinute şi evoluţia lor în timp.

În general, un laborator de culturi *in vitro* este multicameral. *Amenajarea* lui presupune împărţirea spaţiilor în *două zone* principale, net delimitate între ele, în care activităţile se vor desfăşura în regim calitativ diferit, respectiv o *zonă septică* (nesterilă) şi o *zonă aseptică*, în care operaţiunile se petrec, în cea mai mare parte, în regim steril. Extinderea spaţiilor amenajate – în fiecare zonă – va depinde, în primul rând, de *tipul* manoperelor care se efectuează acolo, de *volumul* de muncă şi de *specificul* acesteia. Astfel, laboratoarele de biotehnologie vegetală, spre deosebire de laboratoarele de culturi de celule şi ţesuturi animale, trebuie să deţină una sau mai multe *camere de creştere*, climatizate şi iluminate artificial, eventual *fitotroane* (de capacitate mai mare sau mai mică, mai ales în unităţile cu profil de cercetare), şi de una sau mai multe *sere*, în cazul fermelor de producţie axate pe livrarea de material săditor, obţinut prin tehnici de micropropagare. În sere sunt *cultivate plantele mame*, *donatoare de explante*, se *aclimatizează* vitroplantulele şi, totodată, se realizează şi o *înmulţire vegetativă*, prin metode convenţionale, a clonelor provenite din vitroculturi, prin recoltarea de butaşi şi înrădăcinarea acestora, în scopul obţinerii de material de plantat care poate fi comercializat. În plus, într-o unitate profilată pe producerea de material de plantat, provenit din vitroculturi, de regulă se are în vedere micropropagarea unui material vegetal *liber de viroze*, situaţie în care trebuie ca în unitatea respectivă să fie amenajate "camere de *termoterapie*", incinte în care plantele mame – timp de mai multe săptămâni (cca 4-5) – sunt crescute în vase de vegetaţie, ţinute la temperaturi de 37-42°C. În acest caz, în unitate trebuie să existe dotarea necesară efectuării *testelor virusologice*, respectiv un dispozitiv tip ELISA, de identificare a prezenţei virusurilor în plantulele regenerate în regim de vitrocultură; determinări virusologice pot fi făcute şi cu teste biologice, de exemplu cu frunze de *Chenopodium*, cultura plantelor test făcându-se în sere, protejate fiind de un potenţial atac viral. Totodată, în oricare unitate trebuie să existe posibilitatea conservării – de scurtă sau de lungă durată – a surselor de germoplasmă. În plus, în cazul unităţilor de producţie, trebuie să existe relaţii de consultanţă şi adresabilitate la laboratoare de virusologie şi de genetică, în vederea

efectuării de teste genetice, pentru a nu se înmulți și stoca *in vitro* un material biologic lipsit de valoare.

Laboratoarelor de culturi de țesuturi și celule vegetale li se impun reguli stricte, specifice, de funcționare, ceea ce presupune adoptarea de către unitățile de profil a unor măsuri organizatorice și operaționale particulare, începând cu respectarea compoziției mediilor de cultură, alegerea corespunzătoare a tipului de recipiente de cultură, a modului și metodelor de asepsizare ale materialului biologic și a instrumentarului cu care se manipulează cormofitoinoculii, a tehnicii de explantare (natura explantelor, mărimea acestora etc.) și de inoculare, durata de cultivare a inoculilor *in vitro*, condițiile în care vitroculturile trebuie incubate și crescute ș.a.m.d. La acestea se adaugă aspectele referitoare la munca desfășurată în regim potențial inflamabil (lucru la flacără, în prezența alcoolului) sau cu vase sub presiune, ceea ce presupune o bună cunoaștere a normelor de protecția muncii etc.

Principiile de organizare ale unui laborator de vitrocultură, mai mare sau mai mic, sunt – în cea mai mare parte – comune. Ele trebuie să răspundă unor cerințe cu caracter general, cum sunt cele de *asepsie* (*autoclave* care trebuie să corespundă volumului de muncă desfășurat zilnic, într-o perioadă mai lungă ori mai scurtă de timp), de organizare a compartimentelor vizând *pregătirea mediilor de cultură* și a *instrumentarului* care servește la inoculare, a aparaturii de laborator (*etuve*, *balanțe*, *pH-metre*, *microscoape*, *baie de apă*, *distilator* și *bidistilator*, numărul acestora și capacitatea lor), etc. Aceste probleme se amplifică atunci când ne referim la o unitate de producție. Altfel se pun, însă, problemele într-o unitate de producție profilată pe operațiuni de micropropagare și altfel într-o unitate axată pe aspecte referitoare la culturile de celule, cu producere de *biomasă* sau de *embrioni* somatici (respectiv de semințe artificiale), condiții de vitrocultură care necesită utilizarea de platforme de agitare (pentru asigurarea accesului oxigenului la celule), ori de sisteme de aerare, în cazul culturilor *mixotrofe* fiind indispensabile dispozitivele de barbotare a mediilor cu oxigen, în timp ce în culturile *fotoautotrofe* este necesar un aport sporit de dioxid de carbon etc.

Unitățile de biotehnologie vegetală, profilate pe *prelucrarea de biomasă* (rezultată din sisteme de cultură aseptică, în *bioreactoare*), utilizată ca materie primă în industria fitofarmaceutică, cosmetică sau chimică, reprezintă un tip aparte de vitroculturi, cu un înalt grad de specificitate, diferit ca dotare (mai ales în ceea ce privește cerințele de aparatură), în raport cu acela din unitățile axate pe *micropropagare*, începând de la faptul că recipientele de cultură (fitoreactoarele), în producția de biomasă, au capacități de până la zeci de litrii; totodată, în unitățile care produc și

valorifică biomasa generată în bioreactoare sunt necesare instalații și dotări pentru prelucrarea unei astfel de bioprodus, care – după colectare – servește la obținerea de biopreparate.

Un grad ridicat de specificitate îl prezintă și unitățile profilate pe producerea de semințe sintetice și artificiale, care – pe lângă bioreactoare – trebuie să dețină instalații de încapsulare a embrionilor somatici sau a apexurilor caulinare, în sferule de alginat, precum și dotările necesare pentru păstrarea acestora, până în momentul livrării și semănării lor. Cu totul alte particularități și cerințe de dotare se pretind laboratoarelor de vitrocultură organizate în cadrul *Băncilor de gene*, profilate pe stocarea vitrocolecțiilor, prin variate proceduri. În astfel de unități, în dependență de specificul metodologiilor adoptate – în caz de *stocare* în regim de "*living colections*", la temperaturi pozitive, coborâte (de cca. 5-7°C) – este necesară amenajarea unor camere de creștere, climatizate și iluminate în regim moderat (circa 500 lucși); în cazul în care se dorește păstrarea vitroculturilor la *frig profund* este necesară dotarea laboratorului cu o aparatură specială, prevăzută cu posibilități de coborâre gradată a temperaturii, până la valori de - 40^{0}C, după care recipientele cu inoculi se stochează în containere cu azot lichid (-196^{0}C), unități care trebuie aprovizionate în permanență cu azotul lichid, el evaporându-se foarte ușor din containerele cu vitroculturi.

Pe lângă unitățile cu specific aparte, trebuie să menționăm și cerințele speciale ale *laboratoarelor de cercetare*, axate pe variate tematici din domeniul vitroculturilor de cormofite, laboratoare care – pe lângă dotările și amenajările comune tuturor unităților profilate pe o astfel de activitate – necesită investiții mari, mai ales în achiziționarea unei aparaturi performante, precum și pentru înzestrarea lor cu o gamă largă de reactivi chimici, în plus față de aceea cu compuși indispensabili preparării diferitelor tipuri de medii de cultură. În cercetare poate fi necesară amenajarea unor laboratoare destinate efectuării unor studii de mare acuratețe, de microscopie optică sau electronică, de microchirurgie, ori de fiziologie, biochimie ș.a.m.d. Pe lângă aceste aspecte, laboratoarele de cercetare trebuie să beneficieze de accesorii de fotografiere, de mare performanță și să dețină o cât mai completă bibliotecă de specialitate.

Deci, problemele care se cer rezolvate în momentul în care se are în vedere organizarea unui laborator sau a unei unități profilate pe domeniul vitroculturilor cu inoculi cormofitici sunt complexe, iar soluționarea acestora va depinde – în primul rând – de *specificul* muncii în unitatea respectivă, de volumul acesteia, de *scopul* urmărit în final și de finanțarea de care se dispune.

3.2. AMENAJAREA UNEI UNITĂȚI DE VITROCULTURI VEGETALE

Spre deosebire de unitățile profilate pe vitroculturi variate (de microorganisme, ori de culturi de celule și țesuturi animale sau umane), practicile de cultivare *in vitro* a explantelor de origine vegetală ridică probleme specifice acestei activități, atât în momentele de *inițiere* a culturilor *in vitro* (respectiv a *culturilor primare* și a *subculturilor*, cerințe care rezidă în particularitățile ce caracterizează speciile cormofite, din punct de vedere morfofiziologic, biochimic, ecologic și, nu în ultimul rând, genetic), cât și în ceea ce privește procedurile de *incubare* și de *creștere* a vitroculturilor; în cazul în care se dorește transferarea *ex vitro* a plantulelor regenerate *in vitro*, provenite din variate categorii de cormofitoinoculi, sunt necesare – pe lângă camere de creștere (prevăzute cu dotări adecvate susținerii proceselor fiziologice normale a acestora, respectiv lumină, temperatură și ventilație) – și amenajări care să permită atingerea unui cât mai ridicat procent de viabilitate în etapa de *aclimatizare* a vitroplantulelor, transferate din mediul aseptic în mediul septic, respectiv într-un regim protejat de viață sau în mediul natural.

Din cele arătate, rezultă că modul de amenajare al unei unități profilate pe operațiuni de vitrocultură, la cormofite, va depinde – în primul rând – de *scopul* urmărit, care pot să vizeze fie efectuarea de cercetări cu caracter fundamental (cu sau fără extinderea experimentelor în faze modulare, de micropilot, ori de microproducție), fie, în al doilea caz, de producție lărgită, de amploarea dată acestor activități, ori de producere *de material de plantat*, ce se comercializează, sau de *biomasă*, utilizată ca materie primă într-o serie de bioindustrii vegetale.

În general, amenajarea unui laboratoar profilat pe efectuarea de vitroculturi de țesuturi și celule vegetale, cu caracter *demonstrativ* (în școli și în universități), nu ridică probleme deosebite; simpla amplasare a unor hote, prevăzute cu flux laminar de aer steril, în încăperi curate, suficient de mari pentru a asigura cu ușurință, accesul operatorilor la masa de lucru și posibilitatea observării desfășurării inoculărilor, de către mai mulți privitori, se dovedește a fi o soluție satisfăcătoare. În general, este de dorit ca fiecare operator să lucreze singur la câte o hotă, pentru că doi operatori – amplasați în același perimetru de lucru – se incomodează reciproc, mișcările stângace conducând la ratarea reușitei unor inoculări, din cauza creșterii pericolului

producerii de infecții; dacă prelevarea explantelor și inocularea acestora s-a făcut conform procedurilor corecte, vitrocultura va fi realizată cu succes, cormofitoinoculii supraviețuind. După inoculare, vitroculturile vor fi trecute pe rafturi, iluminate cu lumină fluorescentă. Pentru prepararea mediilor de cultură sunt suficiente dotările unui laborator de chimie, iar pentru asepsizarea mediilor poate fi utilizată o kuktă de 8-10 litri. Eventual, recipiente cu medii de cultură aseptice pot fi comandate la laboratoare de specialitate, profilate pe un astfel de comerț.

Atunci când se are în vedere efectuarea unor lucrări de o mai mare precizie și o mai extinsă anvergură, este obligatorie organizarea diferitelor etape de lucru, în spații separate, special amenajate, destinate realizării fiecărei activități operaționale, în parte, fapt care presupune dotarea încăperilor cu mobilier adecvat, cu aparatură și sticlărie de laborator, cu variate recipiente ce pot fi utilizate fie ca flacoane de cultură, fie în alte scopuri, cu instrumentar de prelevare și de inoculare a explantelor, dar și cu *incinte de aclimatizare* amenajate pentru creșterea *ex vitroplantulelor* etc. Potrivit specificului muncii preconizate să se desfășoare în fiecare încăpere, precum și a corelării acesteia, per ansamblu, cu munca executată în alte laboratoare, într-o unitate trebuie să se asigure continuitatea și randamentul fluxului operațional global, evitându-se amplasarea diferitelor încăperi cu activități înlănțuite, în zone îndepărtate unele de altele, atât pentru a se utiliza cât mai eficient timpul de lucru, cât și pentru a asigura – în perimetrul *aseptic* – un regim corespunzător de sterilitate.

În dependență de volumul de muncă și de specificul acesteia, spațiile destinate diferitelor sectoare și dotările aferente (instalații, mobilier, aparatură, sticlărie, instrumentar, reactivi ș.a.m.d.) vor fi mai mult sau mai puțin extinse. Se va avea în vedere și amenajarea de *compartimente anexe*: magazii de materiale, vestiare, dușuri, grupuri sanitare, cameră de odihnă (destinată operatoarelor de la hote), sere, ateliere, sisteme de ventilație și de termoreglare, camere de creștere și de termoterapie, pompe, grup electrogen etc. Este evident faptul că, într-o unitate de tip industrial, axată pe vitroculturi, întreg ansamblul trebuie realizat în urma întocmirii unui proiect executat de specialiști, care să ia în calcul, în detaliu, toate elementele tehnice, pentru ca în momentul intrării unității în funcțiune, aceasta să producă, conform planificării făcute și a cerințelor avute în vedere. Dar, indiferent de amploarea lucrărilor preconizate să se desfășoare într-o unitate de acest tip, *scopul* urmărit de fiecare laborator în parte va juca rolul major. Chiar și în cazul în care unitățile sau laboratoarele de vitroculturi au destinații diferite, în acestea există și activități cu specific comun. În toate

cazurile, se va acorda o atenție sporită problemelor de *asepsie* și de *curățenie*, și un interes major aplicării regulilor de *protecția muncii*, de prevenire a incendiilor și de acordare a primului ajutor, în caz de accidente.

În amenajarea unei unități de biotehnologie vegetală, axată pe producerea de material săditor, de exemplu la *căpșun* (după *Damiano*, 1980), necesarul minim ar fi de *5 încăperi*, dintre care două trebuie destinate efectuării de operațiuni în *regim aseptic*; astfel, într-o încăpere de cca. 10 m², se va monta o hotă cu flux laminar de aer steril (fig. 3), în care va fi amplasat un stereomicroscop – cu sursa proprie de iluminat și cu posibilități de reglare a intensității acesteia – iar într-o a doua încăpere, de cca. 30 m², se vor

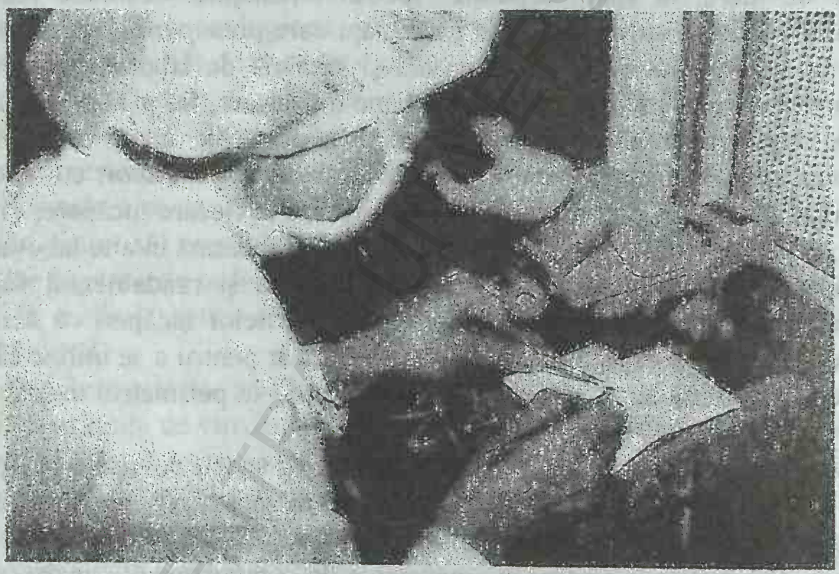


Fig. 3. Operatoare prelevând explante meristematice la stereomicroscopul montat în hota cu flux laminar, orizontal, de aer steril

instala două hote cu flux laminar de aer steril, cu o deschidere de lucru de 1,5 m, fiecare; la o hotă va lucra câte o singură persoană. Cea de a doua încăpere aseptică va fi destinată efectuării de repicări, respectiv de *subculturi*. Randamentul zilnic al unui operator este apreciat ca fiind de cca. 100-120 prelevări și inoculări de meristeme, volum de muncă suficient pentru producerea a cca 1.000.000 vitroplantule de căpșun, în decursul unui an, activitatea de inoculare fiind repartizată în două sezoane de activitate. Fiind vorba de vitroculturi, prin care se produce material de plantat, este necesară și amenajarea unei *camere de creștere* (fig. 4), în *regim septic*, care poate avea o capacitate de aproximativ 60 m²; într-o astfel de încăpere, amenajată

corespunzător cu rafturi metalice, prevăzute cu polițe, pot fi stocate simultan, circa 7500 borcane a câte 500 ml, având un diametru de 10 cm, fiecare dintre acestea deținând în jur de 40 vitroplantule de căpșun. Pentru inocularea propagulilor de căpșun, în borcane, este necesară o lună de zile, zilnic fiind realizate vitroculturi în circa 500-600 borcane. După inoculare, vitroculturile sunt trecute pe rafturi, în camera de creștere. *Rizogeneza* va fi observabilă după cca. 15 zile de la inoculare, iar *aclimatizarea* vitroplantulelor înrădăcinate se apreciază că se poate realiza în cca. 45 zile. Pentru parcurgerea unui ciclu complet, de la inoculare și până la trecerea vitroplantulelor de căpșun în teren, sunt necesare circa 60 de zile. În vederea asigurării materialului de plantat necesar pentru un sezon, o parte dintre explantele inoculate pe medii aseptice vor fi păstrate, fără operarea de subculturi, timp de mai multe luni, într-o *cameră frigorifică* sau cameră rece (fig. 5), cu dimensiunea de 12 m², termostatată la temperatura de 2°C. Faza de dezvoltare a vitroculturilor, corespunzătoare stocării acestora în camera frigorifică, este aceea de vitroplantulă neînrădăcinată, sau de plantulă aflată în stadiul de preaclimatizare. O încăpere, de circa 15 m², trebuie destinată autoclavării și spălării veselei și a sticlăriei; pentru sporirea randamentului muncii într-un astfel de sector se recomandă instalarea unei mașini automate de spălat, sau utilizarea unor recipiente de cultură din material plastic, de unică folosință, livrate sterile, caz în care se reduc costurile aferente operațiilor de lavare a sticlăriei și de presterilizare a acesteia la *sec*, în etuvă. *Numărul persoanelor*

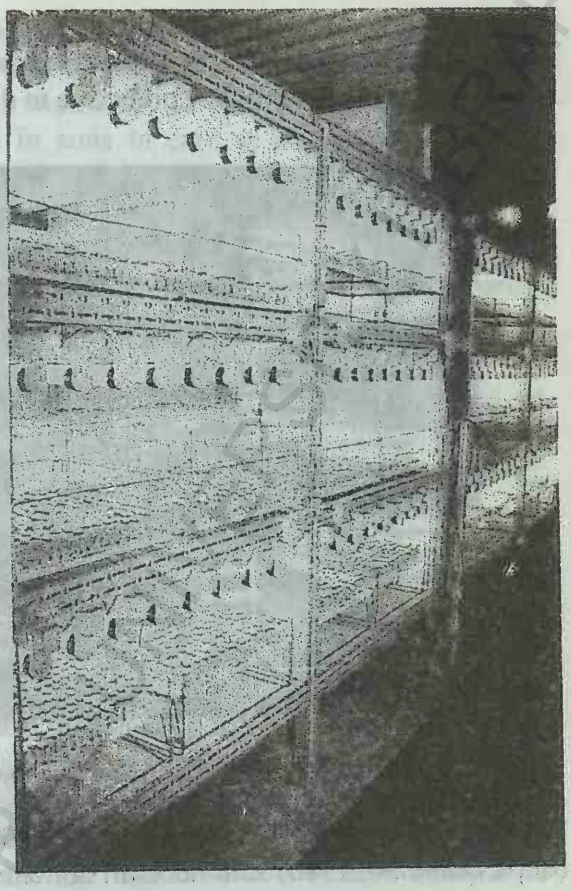


Fig.4. Cameră de creștere climatizată. Etajere amenajate pentru expunere la lumină artificială a vitroculturilor

angajate într-o astfel de unitate va depinde nu numai de volumul de muncă preconizat a se desfășura în diferitele compartimente, ci și de gradul de *automatizare* al operațiunilor practicate în diferitele etape de lucru.

Fig. 5. Cameră frigorifică

Pentru producerea anuală a 1.000.000 de vitroplantule de căpșun, (după *Damiano*, 1980) sunt necesari doi tehnicieni, specializați în domeniul vitroculturilor, un tehnician calificat în cultura de seră și un muncitor necalificat, destinat efectuării operațiunilor brute și simple.

În asigurarea bunului mers al muncii, într-o unitate profilată pe producerea de material săditor prin tehnici de micropropagare *in vitro*, trebuie stabilite relații de colaborare cu laboratoare de cercetare, de specialitate, care să indice măsurile ce se cer aplicate în cazul în care fluxul tehnologic este perturbat sau, dacă, la nivelul vitroculturilor apar fenomene fiziologice sau genetice nedorite. Comercializarea materialului de plantat rezultat din vitrocultură presupune însoțirea acestuia cu un certificat de calitate care să ateste, din punct de vedere genetic și fitopatologic, valoarea răsadurilor pe care unitatea le livrează producătorilor horticoli.

Organizarea spațiilor într-un perimetru destinat realizării de vitroculturi va depinde și de *natura* și amploarea operațiunilor care urmează să fie efectuate în zona în care se execută manopere în *condiții nesterile*, în așa numita *zonă septică* (lucrări care privesc activități ce se desfășoară în:

laboratorul de preparare a mediilor de cultură, în spălător, în vestiar, în laboratorul de testări virale, în încăperea cu autoclave, în camerele de creştere sau în cele de termoterapie, în perimetrul sau în camera frigorifică, în magazie şi în seră etc.), precum şi în zona în care se munceşte în condiţii *sterile*, *zonă aseptică*, constituită dintr-o incintă sau o cameră sterilă, de regulă prevăzută cu una sau mai multe nişe aseptice, ori hote cu flux laminar, orizontal sau vertical, de aer steril, în care se procedează la *dezinfectarea* materialului vegetal, la spălarea acestuia postasepsizare, la *prelevarea*, *fasonarea* şi *inocularea* explantelor, sau la subcultivarea, respectiv repicarea vitroculturilor şi transferarea lor pe medii aseptice, proaspete.

Amenajarea unei unităţi multicamerale, profilate pe efectuarea de culturi *in vitro*, trebuie să corespundă nu numai specificului muncii prestate şi naturii acesteia, ci şi volumului de muncă care urmează să se desfăşoare, în general, în fiecare compartiment, în parte.

3.2.1. Amenajarea zonei *nesterile*

3.2.1.1. Spălătorul

Spălătorul este încăperea în care se desfăşoară activităţi comune, multiple, începând de la debarasarea de pământ a materialului biologic sau a recipientelor de cultură, de mediile infectate, ori a celor rămase după evacuarea vitroculturilor din ele şi până la spălarea şi uscarea acestora. Pentru amenajarea unei încăperi ca spălător (în scopul lavării sticlăriei sau a altor obiecte, inclusiv a materialului biologic adus din teren), este necesar să avem la dispoziţie un spaţiu corespunzător ca mărime, aprecierea mărimii camerei făcându-se după volumul de lucrări care urmează să fie desfăşurate într-un astfel de loc şi de numărul persoanelor care vor lucra concomitent, într-o astfel de încăpere. Într-o unitate cu cerinţe modeste, o încăpere de cca. 16 m^2, cu ciment pe jos sau cu gresie, şi cu canalizare în pardoseală, este potrivită destinării ei unui astfel de scop. Spălătorul va fi prevăzut cu bazine mari (de cca 1 m lungime, 50 cm adâncime şi 40 cm lăţime), faianţate sau din fontă smălţuită, ori din inox, în care se va face înmuierea şi, apoi, spălarea sticlăriei (numărul bazinelor sau a chiuvetelor şi mărimea acestora depind de volumul lucrărilor). Debarasarea mediilor agarizate (infectate sau după eliberarea acestora, în urma transferării "ex vitro" a culturilor) se va face prin colectarea mediilor gelozate şi evacuarea lor la gunoi, ne fiind permisă aruncarea mediilor agarizate în instalaţiile sanitare, deoarece agarul înfundă sistemul de canalizare. Recipientele golite, având pe pereţi resturi de mediu agarizat, prealabil lavării, ele trebuie înmuiate, un timp, de

preferat în apă caldă. În cazul în care în laborator nu dispunem de apă caldă, curentă, se recomandă montarea unui boiler, în apropierea chiuvetei. Deasupra uneia dintre chiuvete se va amplasa un recipient (de 5-10 l) cu apă distilată (prezentând scurgere bazală, unde se va monta un tub de cauciuc, prevăzut cu clemă), necesară limpezirii finale a sticlăriei. Este de dorit ca bazinele și chiuvetele să fie instalate în apropierea ferestrelor, pentru ca iluminarea zonei să fie cât mai corespunzătoare; în caz contrar, zona va fi prevăzută cu un sistem de iluminare, lumină care să asigure, cu ușurință, verificarea gradului de curățire al obiectelor spălate.

În vecinătatea chiuvetei trebuie să existe cutii pentru gunoi, cu capac (preferabil cu pedală), un suport pentru perii (periile de forme și mărimi variate, ce servesc la spălarea sticlăriei), și tăvi prevăzute cu perforații sau cu grătare pentru scurgerea apei de pe sticlăria spălată; pe pereții din apropierea bazinelor sau a chiuvetelor, vor fi montate rastele, pentru uscarea sticlăriei. Pe restul pereților din spălător vor fi amplasate dulăpioare ce vor fi utilizate pentru depozitarea sticlăriei sau a altor materiale, ori a reactivilor care nu necesită condiții speciale de păstrare, ei suportând o atmosferă mai umidificată.

La loc ferit, vor fi amplasate vasele cu amestec cromic, necesar pentru curățirea sticlăriei de laborator.

Chiuvetele, în toate încăperile, vor fi prevăzute cu săpun (preferabil lichid), cu prosoape (de preferință din hârtie) și cu cutii ce conțin șervețele absorbante.

La loc vizibil și ferit de umiditate, va fi amplasată o *trusă medicală*, care va conține pansamente sterile, fețe, vată, apă oxigenată, tinctură de iod, rivanol, unguente cu antibiotice, praf de sulfamidă, leucoplast, fiole de algocalmin ș.a.m.d., dotări necesare acordării primului ajutor în caz de tăiere, arsură etc. (a se avea în vedere controlarea momentului expirării medicamentelor și înlocuirea acestora, din timp).

3.2.1.2. Încăperea cu autoclave, distilator (bidistilator) și etuve

Într-o unitate de vitrocultură, o încăpere va fi destinată montării uneia sau a mai multor *autoclave* (în funcție de cerințe). Dimensiunea acesteia va depinde de numărul autoclavelor ce se dorește a fi instalate în ea, de tipul și gabaritul lor, de sistemul de deschidere și de amplasamentul vertical sau orizontal al incintei de sterilizare, dar și de mobilierul sau aparatele care urmează să fie instalate în aceeași încăpere. Pentru a nu se produce o strangulare a fluxului operațional, în cazul întreruperii energiei electrice,

este de dorit să dispunem de două tipuri de autoclave, o autoclavă electrică şi o a alta încălzită cu gaze. Autoclava este bine să fie de o mai mare capacitate, pentru a putea fi sterilizate concomitent cât mai multe flacoane cu medii, fapt indispensabil mai ales în cazul efectuării de experimente comparative, specifice laboratoarelor de cercetare, situaţie în care trebuie să existe o cât mai mare uniformitate a culturilor, întrucât numai în acest mod poate fi evitată apariţia de diferenţe care se pot produce în urma intervenţiei unor variaţii ale parametrilor fizici, în decursul procesului de autoclavare.

Încăperea în care se montează autoclava este bine să existe o pardoseală uşor lavabilă (din ciment sau acoperită cu gresie), prevăzută cu scurgere în podea şi cu geam, pentru aerisire sau ventilaţie.

Autoclava electrică (fig. 6) (livrată cu sau fără anexe – *pupinel*, precum şi cu instalaţie de *sterilizat* apă) trebuie racordată, de către specialişti autorizaţi, la reţeaua electrică, la o instalaţie de apă rece, curentă, şi la sistemul de canalizare. Pentru a se economisi combustibil, este bine ca într-o aceeaşi zi să fie efectuate mai multe serii de autoclavări, întrucât o mare parte din energia consumată de autoclavă este utilizată pentru încălzirea acesteia. Mediile pot fi sterilizate şi în autoclave de mai mică capacitate, sau în oale de fiert sub presiune (kukte).

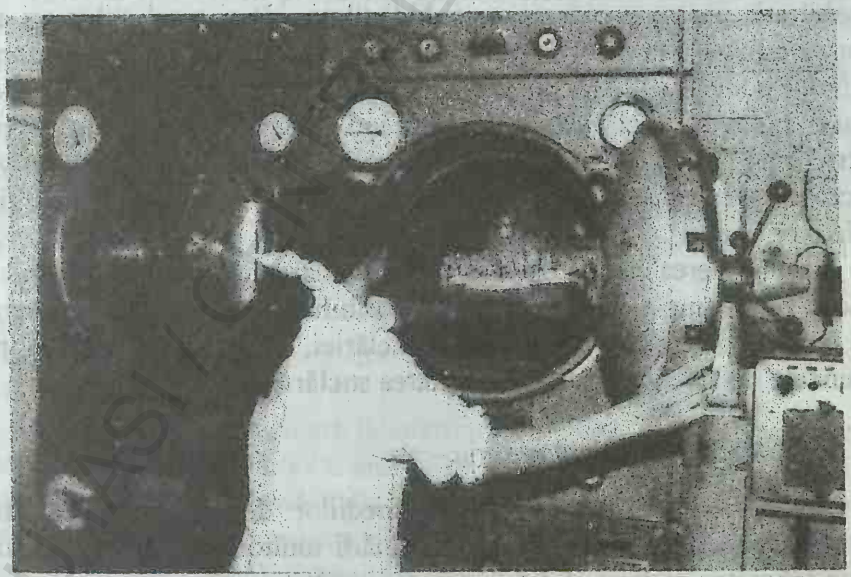


Fig. 6. Autoclave de mare capacitate

BCU IAŞI

Autoclavele vor fi manipulate numai de către personal autorizat, special instruit în acest scop. O neuniformă sterilizare a mediilor, dintr-o aceeaşi tranşă de autoclavare, impune verificarea modului de funcționare a autoclavei, de către specialişti.

În general, atât în cazul manipulării autoclavelor, cât şi al efectuării altor operațiuni, în laborator, se vor respecta cu strictețe *normele de protecția muncii*, întrucât activitatea – într-o unitate de vitrocultură – se desfăşoară în condiții speciale, manipularea necorespunzătoare a autoclavei sau a vaselor aflate sub presiune, poate conduce la producerea de explozii şi la accidentarea personalului.

În încăperea cu autoclave – dacă ea este suficient de spațioasă – pe peretele opus acestora, pot fi montate *aparate de distilat* sau *bidistilat* apa. Dacă autoclava şi distilatorul funcționează cu gaze, se va avea în vedere aerisirea corespunzătoare a încăperii.

Autoclavele electrice sau cele cu gaz, de capacitate mare sau mică, pot fi prevăzute cu orientare şi deschidere verticală sau orizontală. Esențial este ca, autoclava să funcționeze la parametri stabiliți, care să asigure asepsizarea corectă a mediilor de cultură, respectiv distrugerea germenilor, fără a provoca o alterare şi degradare a substanțelor incorporate în acestea.

În laboratorul de biotehnologie, *apa distilată* este un articol indispensabil atât pentru prepararea apei bidistilate, cât şi a soluțiilor ori a mediilor de cultură, sau pentru spălarea materialului biologic asepsizat, ori clătirii finale a sticlăriei. Atât distilatoarele, cât şi bidistilatoarele (de capacitate variată), pot fi din sticlă specială sau din inox, adaptate la încălzire cu curent electric, mai puțin la gaz. Unele distilatoare, de mare capacitate, au vasele colectoare aşezate pe pardoseală; altele, de mai mică capacitate, pot fi suspendate pe perete.

În încăperea cu autoclave şi cu distilatoare, dacă spațiul o permite, pe console, pot fi amplasate 1-2 etuve, cu posibilitate de creştere a temperaturii până la 200°C (destinate presterilizării sticlăriei, la "sec"),iar pe pereți, pot fi suspendate dulăpioare, pentru depozitarea sticlăriei.

3.2.1.3. Laboratorul propriu – zis

Încăperea destinată preparării mediilor de cultură şi repartizării acestora în flacoane, ca de altfel şi efectuării multor altor operațiuni uzuale într-un laborator, trebuie să fie spațioasă, ca să permită accesul concomitent în ea a cel puțin trei persoane.

Laboratorul trebuie să fie iluminat corespunzător şi să fie dotat cu instalaţii de canalizare, cu apă curentă (rece şi caldă), cu gaze, cu instalaţii de vid şi de curent electric. Pardoseala trebuie să fie uşor lavabilă. Mesele de lucru vor fi faianţate sau vor fi acoperite cu folie melaminată, rezistentă la reactivi, pentru a putea fi uşor întreţinute. Acestea pot fi aşezate atât la perete, cât şi în centrul încăperii. Pe pereţi şi sub mese vor fi amplasate dulăpioare, necesare pentru depozitarea sticlăriei şi a substanţelor (în acest scop, vor fi evitate, pe cât posibil, etajerele, ele devenind adevărate "depozite" de praf, care, în laborator, se vor constitui într-o permanentă sursă de germeni contaminanţi).

Laboratorul va dispune de recipiente cu apă distilată şi bidistilată şi de rastele, pentru uscarea sticlăriei.

Mesele de lucru vor fi prevăzute cu instalaţii de gaze (aproximativ 3-4 guri de gaz, repartizate la diferite mese) şi cu prize electrice.

Pe mesele din laborator vor fi amplasate diferite aparate, cum sunt: una sau mai multe *etuve* (dintre care cel puţin una va fi de capacitate mai mare şi va funcţiona în regim de 160-180°C şi o alta, de tip bacteriologic, care va funcţiona în regim termic de 24-38°C, necesară incubării culturilor la întuneric), un *pupinel* (util în presterilizarea instrumentarului), 1-3 *agitatoare magnetice* (preferabil prevăzute cu plită electrică), 1-2 băi marine, de mare capacitate, necesare în prepararea mediilor agarizate, 1-2 *plite* electrice, termoreglabile, *pH-metru, frigider* (prevăzut şi cu congelator de mare capacitate) necesar păstrării soluţiilor stoc, a unor recipiente cu substanţe şi cu medii de cultură, pre- şi poststerilizare (până la utilizare), precum şi a materialului vegetal, până în momentul prelevării de explante (acesta poate fi păstrat şi în camera frigorifică), una sau două *centrifugi* (de diferite capacităţi şi cu turaţii variabile), *instalaţie* de porţionare şi *repartizare* a mediilor de cultură în recipiente (sau seringi destinate acestui scop), balanţe tehnice, ş.a.m.d.

La loc vizibil, în laboratoare, în holuri sau pe căile de acces, vor fi amplasate *extinctoare*.

Într-o încăpere învecinată laboratorului (de cca. 16 m^2), care este de dorit să comunice cu acesta, va fi amenajată o cameră de aparate, în care vor fi amplasate: o *balanţă analitică* (aşezată pe o consolă fixată în perete), *microscoape optice* şi alte aparate de utilitate în laboratoarele de analiză (de exemplu spectrofotometru), computere, şi altele.

Laboratorul trebuie dotat cu un sortiment variat, şi în cantităţi îndestulătoare, de sticlărie, de veselă din porţelan (creuzete, pâlnii, capsule),

tuburi din sticlă, din cauciuc sau metalice (necesare la realizarea diferitelor racorduri), prelungitoare electrice, trepiede, stative variate etc.

3.2.1.4. Camera de creştere

Camera de creştere este destinată păstrării în condiţii optime a vitroculturilor vegetale, în vederea asigurării bunei dezvoltări şi evoluţii a acestora. Întrucât, în general, vitroculturile trebuie expuse la lumină, recipientele cu cormofitoinoculi vor fi amplasate pe etajere, de preferat metalice (cele cu înălţimea de 2 m, de lungimi variabile şi cu polițe de circa 1m lățime, s-au dovedit a fi cele mai practice), polițele fiind confecționate din materiale termo – şi, eventual, electroizolante, uşor de întreținut, preferabil albe, netransparente (de exemplu confecționate din plăci de PAL melaminat), ce vor fi iluminate cu lumină fluorescentă, albă; regimul termic, cel de iluminare şi fotoperioada vor fi reglate automat.

Încăperea rezervată camerei de creştere este bine să aibă pereții zugrăviți în vopsea de ulei sau să fie placată cu gresie ori cu faianță; pardoseala aceteia este bine să fie din ciment sau să fie placată cu gresie, pentru a fi uşor de întreținut. Tuburile fluorescente, menite să lumineze vitroculturile, vor fi amplasate deasupra recipientelor cu cormofitoinoculi, la o distanță de circa 30 - 40 cm de culturi, astfel încât, lumina şi temperatura, la nivelul culturilor, să asigure acestora un regim optim de dezvoltare (fig. 7). În cazul utilizării unor polițe din sticlă, se va avea în vedere ca aşezarea flacoanelor

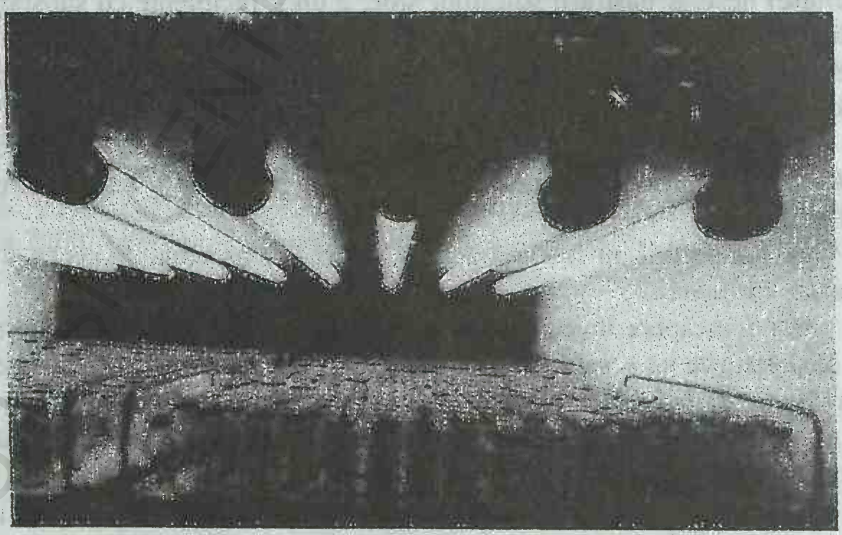


Fig. 7. Poliță cu vitroculturi iluminate cu tuburi fluorescente

să se facă pe un strat izolator, de exemplu pe plăci din polistiren expandat, astfel încât culturile depuse direct pe sticlă să nu sufere un proces de încălzire, sub acțiunea tuburilor de neon amplasate dedesubtul lor, deoarece – într-un asemenea caz – mediile se vor deshidrata, iar compușii chimici din care acestea sunt constituite se vor concentra peste măsură, devenind improprii creșterii și evoluției normale a culturilor. În general, climatizarea camerelor de creștere va corespunde unui regim termic de 25 - 27°C (+ 2°C față de temperatura dorită) și o umiditate nu mai mică de 50%. Fluctuațiile de temperatură, chiar și numai cele provocate ca urmare a întreruperii funcționării tuburilor fluorescente, pe perioada de întuneric, pot cauza modificări ale volumului de aer din recipientele de cultură (prin creșterea sau scăderea presiunii atmosferice din interiorul vaselor de cultură), fapt care poate conduce – în momentul răcirii atmosferei, în perioada de întuneric – la formarea de microcurenți de aer, dinspre exteriorul spre interiorul recipientelor de cultură, și invers, din exteriorul acestora vehiculându-se în recipiente inoculi, sporii și germenii, provocându-se astfel infectarea secundară a culturilor, chiar și după o lungă perioadă de timp de la inocularea acestora.

În laboratoarele de cercetare, adeseori, este indispensabilă amenajarea unor compartimente care să beneficieze de un regim diferit de iluminare a culturilor, ca durată, fotoperioadă, intensitatea luminoasă sau ca natură a luminii, ori ca regim termic, variabil sau constant. Alteori, în camera de creștere este necesară amplasarea de dispozitive prevăzute cu platforme de agitare a culturilor, de mare suprafață, cu mișcări de dute-vino sau de rotație, în plan orizontal, ori de dispozitive cu mișcare de rotație în plan vertical (fig. 8A și B), indispensabile pentru aerarea diferitelor tipuri de culturi efectuate pe medii lichide; uneori, la culturile fotoautotrofe sunt utilizate instalații de barbotare a aerului și a CO_2-ului, în vasele de cultură ori în fitoreactoare, sau în incinte special amenajate. Dacă este posibil, în experimentele efectuate în laboratoarele de cercetare este oportună utilizarea unor camere sau incinte climatizate, de tipul *minifitotroanelor*, necesare desfășurării operațiunilor de *aclimatizare*.

Amenajarea camerelor de creștere trebuie făcută de o așa manieră încât să fie valorificat la maxim spațiul disponibil, permițându-se însă accesul operatorilor, cu ușurință, la recipientele cu inoculi. În cazul în care încăperea nu poate fi climatizată, se recomandă ca distanța dintre polițele cu vitroculturi să se mărească la aproximativ 40-50 cm, pentru ca astfel să fie evitată supraîncălzirea mediilor și a atmosferei din vasele de cultură.

Regimul fotoperiodic optim creșterii mai multor categorii de cormofitoinoculi este de 16 ore lumină/24 ore. Intensitatea luminoasă cea mai frec-

vent utilizată la iluminarea vitroculturilor – la nivelul inoculilor – corespunde la circa 1-2,6 klucşi.

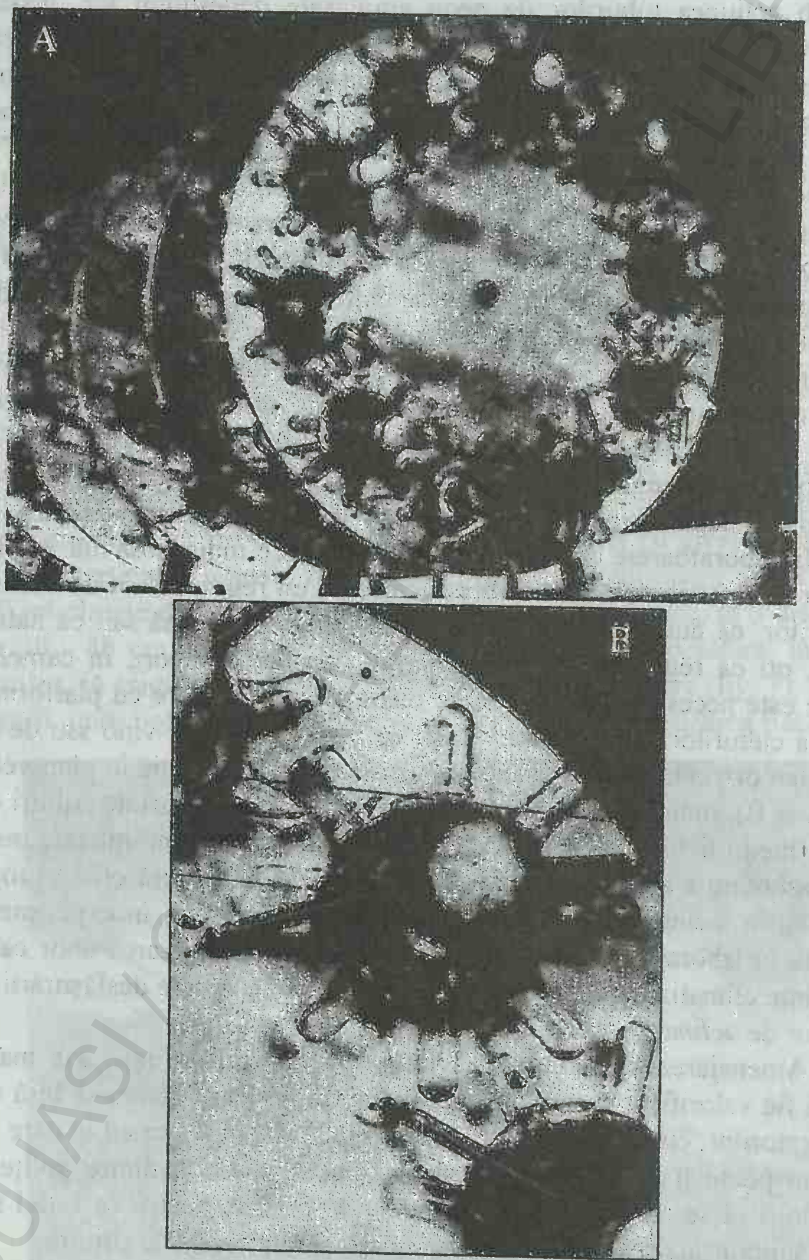


Fig. 8. Agitator care execută mişcări de rotaţie în plan orizontal (A);
- detalii de alcătuire a vaselor de cultură cu mameloane (B).

BCU IASI LIBRARY

În cazul eprubetelor cu vitroculturi, uneori sunt utilizate suporturi, pentru susținerea acestora în poziție verticală sau într-o poziție ușor înclinată, după cerințe. Suporturile pot fi improvizate din materiale diverse, după imaginația fiecăruia și după calibrul eprubetelor. În confecționarea suporturilor, trebuie să se aibă în vedere neumbrirea vitroculturilor, permițându-se accesul facil al luminii, la nivelul inoculilor.

Camera de creștere servește și la parcurgerea primelor etape de pregătire a vitroplantulelor pentru viața în mediul septic, natural, de viață, prealabil transferării "ex vitro" a acestora (operațiune care se face treptat), fiind necesară supunerea gradată a vitroplantulelor la un regim mai puțin hidratat, dar și la curenți de aer și la o iluminare mai putenică a acestora, situație în care este necesar ca, pe parcursul procesului de *aclimatizare*, să se realizeze treaptat acomodarea ex vitroplantulelor la uscăciune, adaptarea presupunând și trecerea acestora de la un metabolism *heterotrof* sau *mixotrof*, la un metabolism *fotoautotrof*. În cadrul acestui proces, se urmărește decopertatrea temporară, la început de scurtă durată, a recipientelor de cultură, prealabil transferării *ex vitro* a plantulelor, sau se poate proceda la obturarea flacoanelor cu dopuri de vată sau din burete, ori la perforarea foliei de polietilenă cu care au fost acoperite flacoanele cu vitroculturi, pentru a se facilita și intensifica schimburile de gaze, între recipiente și atmosfera externă. După un timp, se trece la scoaterea dopurilor și la ridicarea gradată a regimului de uscăciune a atmosferei din flacoanele cu vitroplantule, pentru a forța intrarea stomatelor în funcțiune. Transferarea *ex vitro* a plantulelor se poate face și direct în substrat (aseptic sau septic), îndepărtându-se în prealabil, prin spălare, mediul de cultură de pe rădăcinițe; după plantare, culturile vor fi acoperite cu sub coviltire (fig. 9), confecționate din folie de polietilenă transparentă, sau vor fi ținute sub clopote din plastic. Inițial, gradul de umiditate al atmosferei din imediata apropiere a ex vitroculturilor trebuie să fie mai ridicat, pentru ca, apoi, treptat, uscăciunea aerului să se apropie de normal, moment în care se consideră că vitroplantulele sunt pregătite pentru regimul de viață *ex vitro* și se procedează la decopertarea definitivă a plantulelor, ele fiind deja aclimatizate la mediul septic de viață. În perioada de pregătire a vitroplantulelor, *in vitro* fiind, pentru transferarea lor în mediul septic, se recomandă creșterea intensității luminoase până la valori de aproximativ 10 Klucși, pentru a se favoriza diferențierea aparatului stomatic, a parenchimului asimilator și a cloroplastelor.

În anul 1992, *Kim* și colaboratorii au pus problema iluminării vitroculturilor vegetale prin înlocuirea tuburilor fluorescente cu diode luminiscente (LED-uri), reducându-se astfel emisia de căldură și scăzându-

se cu 95% consumul de energie electrică (Agricell Rep., 1992, vol.18, nr. 5, 37); la LED-urile – emitente de lumină de culoare roşie sau galbenă, se pot adăuga panouri cu LED-uri emitente de lumină de culoare albastră, lumină care pare mai potrivită pentru obținerea de vitroplantule de o mai bună calitate (din Agricell Rep. 2000, vol.34, nr. 4, 25-26).

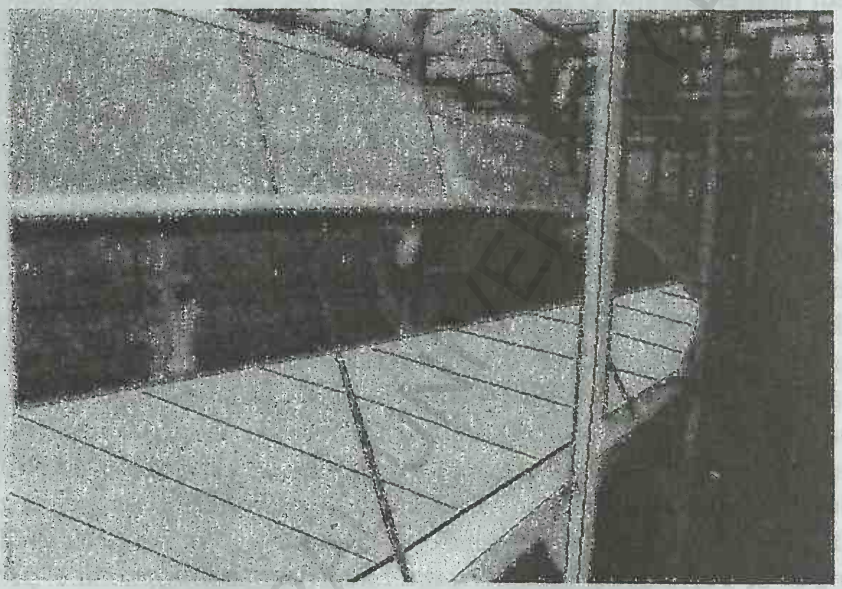


Fig. 9. Coviltire din schelet metalic, îmbrăcat în folie de polietilenă transparentă şi incoloră, cu care sunt acoperite parapetele

La cele arătate, adăugăm şi existența unor sisteme închise, automate (robotizate), de producere de vitroplantule constând din incinte sau din camere de creştere sterile, cu atmosferă recirculată şi controlată; la momentul potrivit, vitroplantulele sunt scoase din agar de către nişte "brațe robotizate" şi sunt transplantate în suporturi poroase, amplasate în vase de circa 20 l. În aceste incinte, creşterea vitroplantulelor, udarea şi aprovizionarea lor cu nutrienți, se face în mod automat, prin monitorizarea culturilor de către computere (*Bajaj*, 1991a; *Miles* şi *Kutz*, 1991).

3.2.1.5. Sera

Un laborator axat pe vitroculturi de specii cormofite, în general, este de dorit să dispună de o seră, în care să fie cultivate fie plantele mame, donatoare de explante, fie – în alte compartimente – să fie plantate vitroplantulele generate *in vitro*, postaclimatizare.

În *unităţile de producţie*, compartimentul de culturi protejate va fi construit dintr-un complex de sere, fiecare seră având o destinaţie specială (sera cu plante mame, sera de aclimatizare a ex vitroplantulelor, sera cu plante test pentru identificarea prezenţei virozelor, sera cu plante superelită sau elită - fig. 10A - şi sera sau serele prevăzute cu parapete, pentru înmulţire prin butăşire - fig. 10B - a plantelor certificate, în scopul obţinerii materialului de plantat pentru comercializare). Amenajarea şi capacităţile acestora, vor depinde de volumul şi natura lucrărilor desfăşurate, de speciile cu care se lucrează într-un anumit sezon sau pe parcursul întregului an. În cazuri speciale, pot fi organizate sectoare cu iluminare artificială, suplimentară, a culturilor.

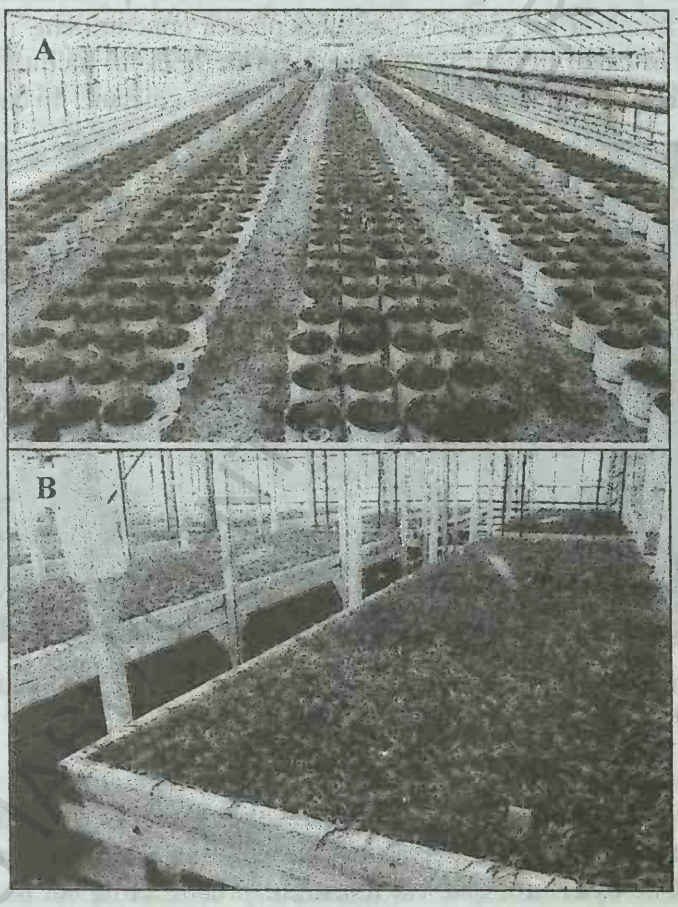


Fig.10. Sere pentru cultivarea la sol, în vase de vegetaţie, a plantelor superelite (A) şi cu parapete (B), care servesc la înrădăcinarea butaşilor

3.2.2. Amenajarea zonei sterile, aseptice

Zona sterilă (mai ales în laboratoarele profilate pe micropropagare *in vitro*) este constituită din încăperi, în care se fac inoculările, şi din căile de acces; dar, în perimetrul steril, cea mai importantă încăpere este *camera de inoculare*.

3.2.2.1. Incinta sterilă sau camera de inoculare

Încăperea în care se fac inoculările, sau *incinta sterilă*, poate avea dimensiuni mici. În aceasta se amplasează o hotă cu flux laminar de aer steril. Dimensiunile camerei de inoculare vor fi mai mari, dacă în aceasta vor fi montate mai multe hote (fig. 11.), numărul acestora şi dimensiunile lor depinzând de numărul persoanelor care inoculează concomitent, într-o aceeaşi încăpere. În cazul în care nu se dispunem de hotă, în incinta sterilă se poate improviza o *nişă aseptică*, cu perete frontal culisant, în care vor fi

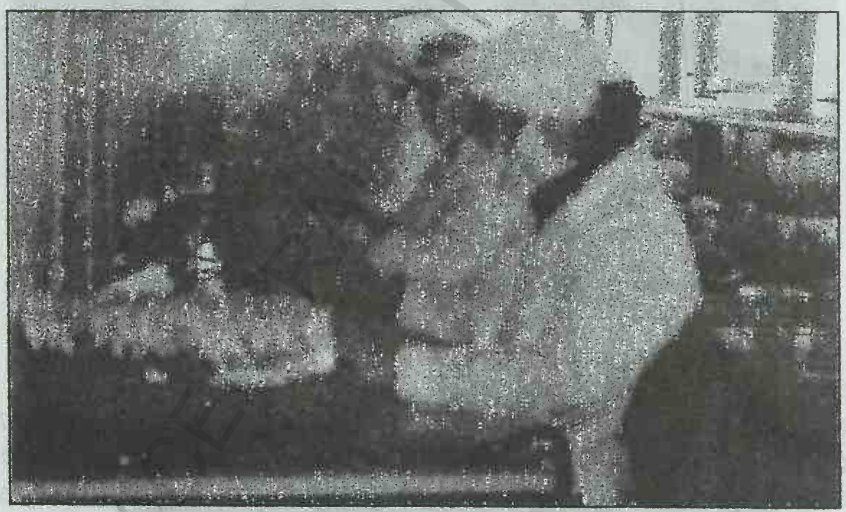


Fig. 11. Încăpere sterilă, de mari dimensiuni, cu hote cu flux laminar de aer steril

făcute inoculările. În cazul unei unităţi profilate pe operaţiuni de vitrocultură, de anvergură, pentru a preîntâmpina vehicularea în această zonă a germenilor, atmosfera din încăperea unde se practică inoculările trebuie să fie bine izolată de exteriorul clădirii, ferestrele şi uşile să fie cât mai etanşe, pentru ca să nu se formeze curenţi de aer. Este de preferat ca pereţii încăperii sterile să fie vopsiţi în ulei, sau să fie placaţi cu faianţă, iar pardoseala să fie din ciment (mai ales la laboratoarele cu activitate intensă), sau placată

cu gresie, ori acoperită cu linoleum, pentru a fi uşor lavabilă; se va evita prezenţa canalizării în podea, pentru a preîntâmpina răspândirea germenilor din sistemul de canalizare, în atmosfera din încăperea sterilă. Incinta sterilă este bine să fie amplasată în apropierea laboratorului de preparare a mediilor de cultură (eventual să fie despărţită de acesta printr-un perete de sticlă, prevăzut cu uşă glisantă), pentru ca cei ce lucrează în laborator să-i poată supraveghea pe acei care operează în incinta sterilă, spre a se putea interveni operativ în acordarea de asistenţă sau de prim-ajutor, în special în caz de incendiu. Pentru a facilita comunicarea dintre camera sterilă şi o încăpere din apropiere, este oportună fie montarea unei sonerii de avertizare, fie a unui interfon.

Hotele cu flux laminar de aer steril vor fi montate în încăperea destinată efectuării operaţiunilor aseptice, pe peretele opus uşii sau a ferestrelor. Orientarea hotelor se va face astfel, încât în interiorul hotei să fie evitată formarea de turbioane, în momentul deschiderii ferestrelor sau a uşilor. Ele sunt de forme şi dimensiuni variate şi sunt prevăzute din construcţie, cu filtre speciale, care reţin particulele mai mari de 0,2 microni; aerul steril – lipsit de germeni, de spori, de particule de praf, de vapori şi de fum – este distribuit sub presiune, pe întreg perimetrul hotei, baleind toate suprafeţele, evacuându-se în zona de deschidere a hotei, înspre operator. Atât timp cât fluxul laminar de aer steril "scaldă" întreaga hotă, din exteriorul acesteia nu vor pătrunde, accidental, în interiorul ei, nici un fel de germeni, decât în cazul în care operatorul face mişcări necontrolate. Filtrele hotei trebuie înlocuite periodic, deoarece acestea, în timp, se uzează sau se colmatează. Uzura filtrelor este mai pronunţată atunci când hota este montată într-o încăpere cu praf, fum, sau cu umezeală, întrucât – în astfel de situaţii – porii filtrelor se colmatează mai repede; filtrele mai pot fi deteriorate şi în urma străpungerii acestora cu obiecte contondente.

Prin utilizarea hotelor cu flux laminar de aer steril creşte randamentul şi eficienţa muncii în inoculare, se reduce la minimum incidenţa infecţiilor primare, sporeşte confortul operatorilor şi previne instalarea oboselii.

Manevrele efectuate în condiţiile inoculărilor făcute în hotă cu flux laminar de aer steril presupun deprinderea operatorului cu un mod controlat, special, de executare a mişcărilor în perimetrul hotei, nefiind permisă introducerea braţelor în hotă, fără ca acestea să fie şterse, în prealabil, cu alcool etilic 70^0; se interzice, de asemenea, interpunerea mâinii operatorului, a pensei sau a altor obiecte (chiar aseptice fiind), între curentul de aer steril şi recipientul deschis; în caz contrar, adeseori, procentul de infecţii poate fi

mai ridicat decât în condițiile executării corecte a aceloraşi operaţiuni, în nişele aseptice improvizate, sterilizate cu radiații ultraviolete (UV), deoarece curentul de aer poate baleia eventuali germeni de pe mâini sau de pe obiectele cu care se lucrează, pe mediile din recipientele de cultură, ori pe viitorii inoculi. Atunci când nu dispunem de o incintă sau cameră sterilă, hota cu flux laminar de aer steril o putem instala şi într-o încăpere obişnuită, curată, dar, într-un asemenea caz, creşte riscul producerii de infecții şi de colmatare mai rapidă a filtrelor montate în hotă. Din construcție, hota este prevăzută şi cu un prefiltru, din burete poliuretanic; din timp în timp (de exemplu lunar), acesta trebuie spălat, după uscare, urmând a fi reinstalat la locul de unde a fost detaşat. Prin această procedură se va prelungi durata de menținere a unei bune funcționalități a filtrelor de bază.

Hotele cu performanțe superioare asigură un debit al curentului de aer steril de 27 ± 3 m^3/minut. Prealabil inoculării, este oportun ca – timp de aproximativ 20 minute – în încăpere să funcționeze o lampă UV. Înaintea începerii operațiunilor de inoculare, hota va fi încărcată cu obiectele sterile de care avem nevoie.

În incinta sterilă sau în camera sterilă pot fi introduse una sau două mese mici sau rafturi mobile (cu rotile), preferabil acoperite cu folie melaminată, necesare pentru aşezarea flacoanelor pre- şi postinoculare, precum şi pentru debarasarea pe ele a obiectelor rămase disponibile, după utilizarea lor în cursul operațiunilor de inoculare.

În camera sterilă trebuie să existe scaune, preferabil rotative (cu posibilitate de reglare a înălțimii acestora), suporturi pentru halate, măşti, bonete sau baticuri sterile, precum şi un extinctor, utilizabil în caz de incendiu.

Hota sau nişa sterilă, este bine să dispună de o instalație de vacuum. În spațiul propriu-zis al hotei vor fi aşezate, pe lângă recipientele cu medii de cultură aseptice, pregătite pentru inoculare, şi suporturi pentru aşezarea instrumentarului steril; atât în nişă, cât şi în camera de inoculare, vor fi montate lămpi de iluminat şi tuburi UV. Pe durata emanațiilor UV, se interzice rămânerea operatorilor în camera sterilă, întrucât chiar şi o expunere de scurtă durată, repetată, poate fi dăunătoare; ozonul – generat în atmosferă în urma iradierii UV – este un gaz puternic oxidant. Este interzisă privirea lămpilor UV aflate în funcțiune, în lipsa ochelarilor de protecție; în caz contrar, se pot produce arsuri grave ale retinei. De asemenea, nu este recomandabilă utilizarea de lungă durată a radiațiilor UV în camera sterilă sau în hotă, deoarece acestea şi ozonul pot deteriora, în timp, filtrele hotei.

În general, accesul în incinta sterilă este bine să se facă printr-un vestibul, care să poată fi, la rândul lui, sterilizat cu radiații UV. Vestibulul poate comunica (prin pereți din sticlă) cu camera sterilă; dacă incinta sterilă este mică, este bine ca în pereții de sticlă ce despart camera sterilă de vestibul să fie practicate deschideri circulare (sau pătrate), acoperite cu capace care să fie distanțate de peretele propriu-zis, astfel încât între capac și perete să existe un spațiu prin care aerul să circule liber, iar ozonul și gazele arse, din incinta sterilă, să fie evacuate în vestibul. În cursul inoculărilor, chiar dacă acestea sunt făcute la hotă, este indicat să se evite – pe cât posibil – deschiderea frecventă sau întredeschiderea permanentă a ușilor și a ferestrelor, deoarece curentul de aer care se formează în astfel de situații, poate afecta gradul de asepsie al camerei sterile.

Ușile camerei sterile și cele ale vestibulului trebuie să se deschidă înspre exterior și să aibă sisteme simple, dar sigure, de deschidere, fără să existe pericolul blocării acestora.

În cursul inoculării, operatorii vor fi îmbrăcați în echipament steril, cel mai adesea în halate sterile, luate peste hainele obișnuite, de stradă.

În zona aseptică se încadrează și căile de acces din imediata vecinătate a camerei de inoculare, respectiv culoarele prin care se accede la aceasta, căi care, în cursul nopții este bine să fie sterilizate, în permanență, cu raze UV, mai ales în cazul în care a doua zi urmează să fie făcute inoculări.

3.2.3. Înzestrarea laboratorului de biotehnologie vegetală

3.2.3.1. Sticlăria

Sticlăria de uz comun, în laboratoarele de chimie – biologie, este tipul de sticlărie necesară și în laboratoarele de biotehnologie, și este de preferat ca aceasta să fie din sticlă de bună calitate, termorezistentă, tip Pirex, sau din sticlă borată. Dar, întrucât sticla din silicat de Na este mai ieftină, în vitroculturile practicate în unitățile de producție și această sticlă poate fi utilizată cu succes, ca de altfel orice tip de borcan incolor, folosit în fabricile de conserve.

Pentru prepararea soluțiilor sau a mediilor de cultură sunt necesare vase *Erlenmeyer* și *Berzelius*, de dimensiuni variate, unele de mare capacitate, respectiv de 2-3 l; vasele *Erlenmeyer*, cu tubulatură laterală, sunt indispensabile executării operațiunilor de vidare, de exemplu pentru sterilizarea prin filtrare a mediilor lichide; vasele *Erlenmeyer* de 50, 100, 150, 250 și 500 ml, tip B, pot servi și ca recipiente de cultură. În laborator, sunt necesare și baloane cotate, pipete, cilindrii gradați și menzuri (din sticlă sau din

metal smălțuit) diverse, pâlnii, capsule Petri, casolete, baghete, tuburi din sticlă, sticle de ceas, nuci filtrante, seringi, exicatoare, de mărimi variate, și altele.

Alegerea tipului de recipient, ca vas de cultură, rămâne la latitudinea fiecărui laborator. Dar, în această alegere trebuie să se aibă în vedere accesul facil al operatorilor (cu instrumentar adecvat) la nivelul mediilor de cultură, pe parcursul inoculărilor, numărul și mărimea inoculilor, viteza de creștere a vitroculturilor, într-o anumită perioadă de timp etc. În cercetare, se va ține seama de obligativitatea montării simultane, într-un experiment, la toate variantele, a inoculilor într-un același tip de flacoane, pentru a putea fi evaluate corect și a putea compara rezultatele obținute, la diferitele variante experimentale. În cazul cultivării sau a subcultivării inoculilor în flacoane necorespunzătoare ca mărime, poate duce, în scurt timp, mai ales după repicarea culturilor, la necesitatea unei iminente pasări a acestora în recipiente de cultură mai încăpătoare, cu toate că mediul de cultură din flacon nu a fost consumat, în totalitate (respectiv nu a fost epuizat). Acest fapt, conduce la risipă de substanțe, de efort uman și de timp.

Explantele meristematice se inoculează, de regulă, în flacoane sau în eprubete de talie mai mică, conținând o cantitate minimă de mediu de cultură, inoculii meristematici urmând să crească în astfel de recipiente timp de 6-10 săptămâni. În general, pentru ca inocularea să se poată face cu ușurință, sunt de preferat eprubetele sau flacoanele mai puțin înalte, de circa 10-12 cm. În cazul inoculilor care cresc repede, și a celor care generează o masă bogată de calus, de muguraşi sau de propaguli, este oportună utilizarea unor eprubete cu deschidere de 25 mm, sau a vaselor *Erlenmeyer* tip B, de 50 sau 100 ml, ori a unor flacoane cu deschidere largă, folosite – în general – pentru păstrarea preparatelor farmaceutice sau de uz cosmetic, ori a borcanelor de uz alimentar, sau a capsulelor *Petri* (de dimensiuni variate) ș.a.m.d. Dacă capacele sau dopurile lor sunt mobile, se recomandă ca, după inoculare, acestea să fie imobilizate cu fâșii de leucoplast ori cu parafilm, sau prin acoperirea acestora cu folie de aluminiu.

Eprubetele sau alte tipuri de recipiente de cultură, dacă nu se închid cu capace metalice tip twist, prealabil autoclavării, este de dorit să fie obturate cu dopuri de vată; după inoculare, ele vor fi închise cu folie transparentă, incoloră, din polietilenă, fixată fie prin încălzire, fie cu inele de cauciuc. De menționat este faptul că, la flacoanele cu deschidere mare, obturate cu capace sau cu folie de aluminiu, se reduce gradul de iluminare a culturilor, din cauza opacității acestora. Unele tipuri de explante se pot dezvolta normal și în flacoane din sticlă, închise cu capace metalice. În schimb, în

recipientele cu deschidere largă, obturate cu folie de polietilenă, mediile se deshidratează relativ repede, din cauza suprafeței mari de evaporare; în puls, folia de polietilenă ne fiind total impermeabilă, permite, într-o oarecare măsură, în timp, la temperaturi de 25°C, o deshidratare mai rapidă a mediilor de cultură. Totuşi, pentru obturarea flacoanelor nu se recomandă utilizarea dopurilor din cauciuc, deoarece acestea închid ermetic recipientele de cultură; ele pot fi folosite doar dacă sunt perforate, iar în orificiul creat se amplasează un tubuşor din sticlă, subțiat la extremitatea din exterior, pol la care se introduce un mic dop de vată. Dopurile din cauciuc, sau capacele cu tuburile aferente (având un fitil din burete autoclavabil introdus în perforația practicată în capac), vor fi sterilizate prealabil utilizării acestora.

În cazul culturilor efectuate pe medii lichide, practicate în flacoane montate pe discuri ce se rotesc în plan vertical, sunt utilizate vase de cultură de construcție specială, cu mameloane (fig. 8B) sau cu creste, pe care, în procesul de rotire, explantele rămân expuse temporar, în contact direct cu aerul din recipiente, până la o următoare rotație a discurilor pe care sunt montate recipintele.

Actualmente, ca vase de cultură sunt utilizate mai ales recipiente de unică folosință, din material plastic, livrate sterile, de forme şi mărimi variate, ambalate în pungi din polietilenă. În acest tip de recipiente de cultură, mediul – încă cald fiind (pentru ca agarul să se afle în stare lichefiată), sterilizat într-o autoclavă sau într-o oală de fiert sub presiune – se toarnă ori se porționează cu ajutorul unor dispozitive manuale sau automate, în condiții perfecte de asepsie, ori în hota sterilă. Porționarea unor cantități mici de mediu se poate face şi cu seringi speciale, operabile manual (vezi fig. 12).

Flacoanele cu medii de cultură, în vederea sterilizării lor la autoclavă

Fig.12. Porționarea cu seringă a mediilor de cultură, în recipientele presterilizate, în prealabil

(excepție făcând borcanele cu capace metalice, cu închidere în sistem twist sau de alt tip), este de preferat să fie obturate cu dopuri din vată, înfășurate în tifon. După repetate utilizări, dopurile de vată vor fi aruncate.

3.2.3.2. Aparatura

Dotarea laboratorului de biotehnologie vegetală cu aparatură va depinde de destinația acestuia, de natura lucrărilor efectuate în el și de volumul de muncă.

În afară de autoclave, aparat de distilat și bidistilat apă (eventual coloane cu rășini schimbătoare de ioni), frigidere de mare capacitate, prevăzute cu congelatoare, agitatoare magnetice (cu plită, pentru încălzirea mediilor), balanțe (analitică și tehnică), pH-metru, pupinel, etuve, microscoape, stereomicroscoape, lupe, centrifugi (de mărimi și turații variate), mai pot fi necesare: citometru (pentru numărarea celulelor, în culturile de celule), spectrocolorimetru, cromatografe, umidometru, pompe aer și de vid (în lipsa acestora o trompă de vid, racordabilă la robinetul de apă rece, poate salva situația), dispozitive de repartizare a mediilor, aparat și instalație de fotografiat, de climatizare etc. Dispozitivele necesare culturilor de celule vor fi achiziționate, potrivit scopului urmărit, ori vor fi făcute improvizații, care să poată asigura creșterea în regim optim a culturilor celulare, libere sau imobilizate.

3.2.3.3. Instrumentarul

Vitrotehnicile, în cazul de față cele practicate în cadrul biotehnologiei vegetale, presupun efectuarea de operațiuni de microchirurgie, în care se lucrează cu instrumentar de tip chirurgical: *pense* (de diferite forme și mărimi, mai lungi decât recipientele în care urmează să se facă inoculările), cât mai elastice, fără striațiuni la vârf (dacă ele există vor fi îndepărtate prin polizare), *foarfeci* și *bisturie* (fine, oftalmologice și obișnuite, chirurgicale), *anse*, *cuțite*, *scalpele*, *spatule* (de exemplu de tip stomatologic), *lame* de ras, *ghilotine* (confecționate din lame), necesare pentru dimensionarea de explante, de formă și mărime identică, *perforatoare* (de diferite dimensiuni), care să permită explantarea unor cilindrii de țesut ce pot fi subdivizați, ulterior, cu un bisturiu sau cu ghilotina etc. Menționăm faptul că, obiectele metalice trebuie să fie din metal inoxidabil. În laborator, mai sunt necesare: *ace*, *seringi*, *holdere* (pentru amplasarea filtrelor Millipor), *lămpi* de *spirt*, și altele. Pentru explantarea meristemelor trebuie improvizate *minibisturie*, prin introducerea unor fragmente de lame de bărbierit, în mandrina anselor

(în locul ocupat, altfel, de o sârmă buclată, utilizate la inoculările practicate în laboratoarele bacteriologie sau în inoculările făcute în biotehnologiile care operează cu microorganisme).

3.2.3.4. Materiale diverse

În laboratoarele de biotehnologie vegetală sunt necesare şi o serie de obiecte şi materiale, cum sunt: vase de bucătărie (de circa 5 - 10 l, unele utile în improvizarea de băi marine), site cu azbest, clame, triunghiuri cu şamotă, trepiede, tuburi din sticlă sau din cauciuc, becuri de gaz, prelungitoare electrice, triplu ştechere, perii, vată, truse medicale, şorţuri din cauciuc (la spălătorie), extinctoare, o trusă mecanică (cu cleşti, ciocan, şurubelniţe), termometre de cameră, mănuşi din cauciuc (de uz menajer), leucoplast, folie incoloră din polietilenă, elastice, folie de alăminiu, hârtie de pH (de la 1 - 7), site metalice inoxidabile, tăvi din material plastic sau metalice, coşuri din sârmă, casolete (de mărimi variate), suporturi pentru eprubete, vase şi cutii din plastic, ghivece, perlită, turbă, nisip, vermiculit (utilizabile ca substrat pentru plantarea *ex vitro* a vitroplantulelor), sfoară, tifon, hârtie de filtru şi de împachetat, markere rezistente la apă etc.

3.2.3.5. Compuşi chimici

3.2.3.5.1. *Substanţe şi alte materiale chimice*

În laboratorul de biotehnologie vegetală sunt necesare variate substanţe chimice, utilizate în diverse scopuri. Astfel, pe lângă *săruri anorganice* şi *compuşii organici*, diverşi, în prepararea soluţiilor nutritive, într-un laborator de vitroculturi vegetale sunt necesari reactivi de uz comun, *baze* şi *acizi*, şi unele substanţe indispensabile pentru sterilizarea materialului vegetal şi a suprafeţelor de mobilier, cum sunt: alcoolul etilic (absolut, de 96° sau de 70°), hipocloritul de natriu sau de calciu, ori preparate destinate curăţirii încăperilor şi a obiectelor, detergenţi sau dezinfectanţi (Domestos, Clorox, cloramină etc.), săpunuri (solide sau lichide), sodă de rufe, prafuri de curăţat – de uz menajer – spirt sanitar sau alcoolul etilic tehnic, (utilizabil pentru dezinfectarea suprafeţelor şi pentru umplerea spirtierelor), dar şi solvenţi organici variaţi. În categoria substanţelor chimice de uz comun, intră şi reactivii obişnuiţi din laboratoarele de chimie, şi anume: *acizii minerali* (clorhidric, sulfuric, azotic) şi *bazele* (hidroxizii de K, Na şi de NH_4^+, de puritate tehnică sau cu grad ridicat de puritate), ori reactivii utilizaţi în curăţirea sticlăriei şi necesari în prepararea unor soluţii, dar şi *acizii organici* (acetic, citric, oxalic), *acetona, eter, cloroform* (utilizaţi în cantităţi mici), *dimetil-*

sulfoxid (DMSO), *polietilenglicol* (PEG), *Tween*, *clorura mercurică* (ținută sub cheie, fiind o otravă puternică), *perhidrolul* (compus oxidant și toxic) etc. Pentru o perfectă spălare a sticlăriei, de reziduri variate, este necesar amestecul cromic, un produs extrem de oxidant și coroziv, ce se prepară în laborator, din bicromat de potasiu și acid sulfuric și se păstrează numai în recipiente din sticlă sau din material plastic, rezistent. El se preapară astfel: peste 100 ml de soluție saturată de bicromat de potasiu (30 g bicromat de K se dizolvă la cald în 70 ml apă distilată), se adaugă, treptat (agitându-se balonul într-o baie de *apă rece*), 300 ml de acid sulfuric concentrat; culoarea reactivului – la preparare – trebuie să fie brun-portocalie. Amestecul cromic distruge îmbrăcămintea, oxidează obiectele metalice și arde pielea, motiv pentru care, în laborator, acesta va fi amplasat într-un loc ferit de lovire, pentru a preîntâmpina spargerea vasului sau răsturnarea lui. Vasul va purta o etichetă de avertizare. Eficacitatea amestecului cromic, în timp, va depinde de frecvența utilizării lui; după fiecare folosire acesta va fi recuperat, întrucât poate fi reutilizat, de repetate ori, până în momentul în care din brun-roșcat el devine de culoare verde. Vasele golite de amestec cromic, pentru spălare, vor fi introduse cu atenție sub un jet de apă rece, evitându-se producerea de stropi (este de preferat ca operația să fie executată într-un bazin adânc, faianțat); deșertarea vaselor – la prima limpezire – se va face în timp ce în bazin apa rece va curge în continuu, pentru a fi asigurată o permanentă diluare a resturilor de amestec cromic. A nu se pierde din vedere faptul că, amestecul cromic poate coroda instalațiile de canalizare. Amestecul cromic învechit va fi vărsat în chiuvetă, deșertarea acestuia facându-se concomitent cu curgerea continuă, în aceasta, a unui jet de apă rece.

Principalii compuși chimici care intră în alcătuirea mediilor de cultură sunt de natură *anorganică* (macro- și microelemente) și de natură *organică* (glucide, vitamine, regulatori de creștere, agar etc.).

Elementele chimice și compușii utilizați mai frecvent pentru prepararea mediilor de cultură sunt multipli și sunt prezenți în tabelele 2 - 5 (vezi subcapitolul 3.4.1. pag. 108-115).

Pentru alegerea unui mediu de cultură adecvat creșterii anumitor tipuri de inoculi, nu trebuie să se procedeze empiric (așa cum se practică, de cele mai multe ori), ci trebuie analizat *tipul* de material biologic și de explant folosit, *proveniența* lui, *mărimea* acestuia și, în funcție de acestea și de *scopul* urmărit (respectiv ce tip de vitrocultură se dorește a fi realizată), trebuie să se elaboreze un studiu de specialitate, pe baza bibliografiei de profil. Pentru evitarea unor accidente nedorite, este oportun să se procedeze la tatonarea efectelor a 2-3 rețete de medii de cultură.

Mediile de cultură se prepară numai din substanțe cu un înalt grad de puritate. Dacă nu dispunem de săruri minerale cu specificație *p.a.* (cu grad maxim de puritate), în momentul preparării mediilor de cultură, sau după autoclavarea acestora, ne putem aştepta la surprize în ceea ce priveşte obținerea unor medii de calitate dorită şi a menținerii acestor parametri, în timp

Costul unui litru de mediu de cultură *Murashige-Skoog* (1962) (MS), conform prețurilor din anul 1979 (după *Damiano*, 1980), era de 1,07 dolari. Din acesta se pot pregăti 1000 eprubete de tip hemolitic, sau 700-500 eprubete de alt tip (cu cca. 1,2 - 2 cm^3 mediu/eprubetă). Volumul de mediu introdus într-un recipient de cultură va depinde de forma şi mărimea recipientului, tipul de inocul şi dimensionarea acestuia, specificul culturii, numărul de explante inoculate per flacon (culturi sincrone), durata de cultură etc. De exemplu, meristemele pot fi inoculate în eprubete de mai mică capacitate, cu mai puțin mediu de cultură. În schimb, propagulii – care au dimensiuni mult mai mari decât un apex meristematic – vor creşte mai rapid, iar vitroculturile rezultate vor umple flacoanele în timp scurt, ceea ce va determina o epuizare relativ rapidă a mediilor de cultură, fapt care va conduce la necesitatea operării de subculturi, la intervale scurte de timp, fie la utilizarea – încă de la început – a unor recipiente de mai mare capacitate, cu un volum crescut de mediu.

3.3. ASEPSIA ŞI ASEPSIZAREA

Operațiunea de *distrugere* – pe cale chimică sau fizică – a microorganismelor sau a sporilor acestora, fie *înlăturarea* lor prin filtrare ori/şi prin simplă *spălare*, sau prin *ultrasonare*, poartă numele de *sterilizare* sau *asepsizare*. Dintre agenții *distructivi* ce dețin astfel de proprietăți menționăm factorii *fizici*: *arderea* prin flambare, *încălzirea* (cu *căldură* uscată sau cu vapori supraîncălziți) şi *iradierea* obiectelor cu raze gamma, cu *microunde* sau cu *radiații ultraviolete* (UV) (vezi tabelul 1). O altă procedură fizică de eliminare a microorganismelor sau a sporilor acestora, constă în *filtrare*. Astfel, hotele cu flux laminar de aer steril sunt prevăzute cu filtre bacteriologice şi cu compresoare, realizându-se – odată cu filtrarea aerului – şi imprimarea unei presiuni pozitive, curentului de aer, acesta împiedicând accesul în hotă, din exterior, a germenilor. Lichidele se sterilizează, prin filtrare, trecându-le printr-o peliculă – de exemplu de tip Millipor – care reține germenii, particulele şi pulberile. O altă cale fizică de înlăturare a germenilor constă în *spălarea* obiectelor sau a materialului biologic, în curent de apă, sau în apă staționară (cu adaos de agenți spumanți), ori în

Tabelul 1. Tehnici de asepsizare

Posibilități de sterilizare	Căi de sterilizare	Tipuri de sterilizări	Ce sterilizează	Aparatură și materialele
a) distrugerea germenilor	- fizice	- flambare (flacără), -temperatură ridicată, uscată sau umedă, - radiații gamma, - raze ultraviolete (UV) - microunde	- instrumente, sticlărie - spații, incinte - medii de cultură - instrumente	- becuri Bunsen, etuve, spirtiere, incineratoare, ori pupinele electrice, - generatoare de radiații gamma - lămpi UV - autoclave - vase diferite, kukte - cuptor cu microunde
	- chimice	- antiseptice	- spații, mobilier, suprafețe, material biologic, instrumente - recipiente din material plastic	- alcool etilic 70 – 98% - hipoclorit de Na sau Ca - pentaoxid de etilenă - H_2O_2 - apă bromată - cloramină - clorură de mercur
		- antibiotice	- material vegetal - medii de cultură	- produse farmaceutice
b) eliminarea germenilor	- fizice	- spălare simplă - filtrare (cu pori de 0,2μ) -ultrasonicare	- apă, medii lichide, lipsite de agenți gelificați	- filtre Millipor

băi/bazine prevăzute cu *ultrasunete*. Pentru prepararea mediilor de cultură – mai ales în topirea agarului, ori în sterilizarea instrumentarului – poate fi utilizat și cuptorul cu *microunde*, supunând materialele destinate acestui scop (dacă acestea nu suferă deteriorări în urma unui astfel de tratament), la o iradiere cu o durată de 30 de minute, la 90% din puterea aparatului.

Agenții *asepsizanți chimici*, utilizați în laboratoarelor de biotehnologie vegetală, acționează prin *distrugerea* germenilor, dintre aceștia menționăm: alcoolul etilic – concentrat sau diluat (spirtul sanitar sau tehnic), soluțiile clorurate (hipocloritul de calciu și de natriu), oxidul sau penta-

oxidul de etilenă, apa oxigenată sau bromată ş.a.m.d. Oxidul de etilenă este un asepsizant eficient, dar el prezintă dezavantajul că este inflamabil, exploziv şi toxic, ceea ce impune folosirea lui prin intermediul unor instalaţii speciale, în care vor fi asepsizate obiectele din material plastic (seringi şi recipiente de cultură, de unică folosinţă), precum şi instruirea personalului cu privire la riscurile la care acesta se expune, dacă nu sunt respectate normele de protecţia muncii.

Succesul vitroculturilor va depinde nu numai de măsurile de prevenire a *infecţiilor primare*, condiţie *sine qua non* în realizarea culturilor axenice, ci şi de evitare a apariţiei infecţiilor *secundare*, declanşate după un număr de săptămâni de la inoculare. Prevenirea infecţiilor secundare se poate face nu numai respectând toate regulile de asepsie, la nivelul materialului vegetal, a recipientelor cu medii de cultură, dar şi a operării inoculărilor într-o atmosferă aseptică, cu instrumentar perfect sterilizat, obturând corect flacoanele şi manipulându-le cu prudenţă, evitând atingerea zonei de deschidere a acestora.

În general, în realizarea cu succes a vitroculturilor vegetale un rol major revine nu numai operatorilor care inoculează, ci şi acelora care prepară materialul biologic pentru prelevarea din acesta de explante, sau celor care pregătesc zona în care urmează să se efectueze inoculările. Personalul din unitate, şi mai ales operatorii din incinta sterilă, trebuie familiarizat cu cunoştinţe elementare de microbiologie, cu privire la natura germenilor ce populează suprafeţele, aerul şi apa (virusuri, bacterii, alge, drojdii, mucegaiuri, ori spori ai acestora), căile posibile de producere a infecţiilor şi modalităţile în care acestea pot fi prevenite sau înlăturate (vezi tabelul 1).

3.3.1. Sterilizarea încăperilor, a suprafeţelor şi a instrumentarului

După o prealabilă curăţire a spaţiilor şi a suprafeţelor, asepsia se realizează – în primul rând – prin sterilizarea atmosferei încăperilor, a mobilierului şi altor obiecte amplasate în aceste spaţii. Curăţenia şi dezinfectarea priveşte şi căile de acces, incintele, nişele etc. O atenţie deosebită trebuie acordată nişelor sau hotelor unde se operează inoculările, suprafeţelor şi ustensilelor din zonele respective, a căror asepsizare se realizează, cu precădere, prin iradiere cu radiaţii UV.

În cursul nopţii, perimetrul din zona aseptică este de dorit (inclusiv căile de acces) să se afle sub incidenţa razelor UV. Radiaţiile UV vor fi întrerupte cu aproximativ 30 de minute înaintea începerii operaţiunilor în zona sterilă, întrucât ele, sau ozonul produs de acestea, pot prejudicia sănă-

tatea operatorilor și vitalitatea materialului vegetal. În consecință, ozonul acumulat în încăperi, pe parcursul iradierii cu UV, trebuie să difuzeze în mod pasiv din zonele sterilizate (fără a fi utilizate ventilatoare, în scopul disipării acestuia), pentru a nu fi periclitată sănătatea operatorilor.

Dacă în încăperi dispunem de instalații de aer condiționat, acestea trebuie să fie prevăzute cu filtre speciale de reținere a germenilor, preîntâmpinându-se astfel răspândirea lor în atmosferă.

Casoletele cu recipiente ce conțin medii sterile, ori cele cu instrumentarul asepsizat în pupinel, precum și flacoanele cu inoculi, cu care urmează a se opera în regim aseptic, vor fi stocate în incinta sterilă și, prealabil inoculării, acestea vor fi menținute – minimum 20 de minute – sub incidența directă a razelor UV (menționăm că prin sticla obișnuită razele UV nu penetrează; în consecință, materialul biologic din flacoanele de cultură nu va avea de suferit în urma iradierii acestora). Înainte de încărcarea hotei cu recipiente, provenite din camera de creștere, pentru operarea de subculturi, flacoanele trebuie șterse cu un tampon îmbibat în alcool etilic de 70°, îndepărtându-se astfel praful și germenii de pe ele; de asemenea, prealabil începerii inoculărilor, precum și periodic – în decursul efectuării unui lanț de inoculări – tăblia mesei de lucru va fi ștearsă cu alcool etilic. Hota cu flux laminar de aer steril va fi pusă în funcțiune cu cca 20-30 de minute înainte de începerea inoculărilor, pentru ca fluxul de aer steril să baleeze suprafața de lucru, vehiculând – înspre exteriorul perimetrului acesteia – sporii din aer.

Diluarea alcoolului etilic, pentru a-l aduce la concentrația de 70°, se face în modul următor:

- la 70 ml alcool etilic absolut vor fi adăugați 33,4 ml apă;
- la 70 ml alcool etilic de 96° vor fi adăugați 28,6 ml apă.

Instrumentarul cu care se va lucra în camera sterilă este bine să fie presterilizat, fie prin expunerea acestuia sub incidența directă a razelor UV, fie prin fierbere în baie de apă, electrică (concepută în acest scop), fie prin încălzire în pupinel (excepție facând foarfecele și bisturiele); durata sterilizării va fi de aproximativ o oră. Înainte de începerea operațiunilor de explantare și de inoculare, instrumentarul cu care vor fi dimensionate explantele (bisturie, scalpele, foarfecile, spatule sau pensele) va fi introdus în alcool etilic 70° și, apoi, va fi flambat, sau va fi sterilizat prin căldură, prin introducerea lui în dispozitive electrice, bactericide, amplasate în hota sterilă. După flambare, instrumentele vor fi așezate pe suporturi (improvizate după dorință), pentru a le lăsa să se răcească. Se va acorda multă atenție tuturor operațiunilor efectuate în incinta și în hota sterilă, atât pentru a se evita

producerea de infecţii, cât şi pentru a se preîntâmpina apariţia eventualelor accidente, întrucât în cursul inoculărilor este obligatorie ştergerea periodică a mâinilor cu alcool etilic 70°, precum şi sterilizarea instrumentelor prin flambare, permanent existând pericolul aprinderii alcoolului de pe braţe; picăturile arzânde de alcool – căzute pe masa proaspăt ştearsă cu alcool – pot cauza aprinderea dopurilor de vată debarasate pe suprafaţa tăbliei hotei, ori a foliilor de polietilenă, utilizate pentru obturarea flacoanelor (menţinute în alcool, pentru dezinfectarea), sau se pot prelinge, existând pericolul ca alcoolul aprins să cadă pe hainele operatorilor etc. Nu se va apropia de flacără mâna proaspăt ştearsă cu alcool, existând pericolul permanent de aprindere a acestuia, atât timp cât el nu s-a evaporat pe braţele operatorilor. Pentru a preveni accidentele de combustie, instrumentele – odată scoase din alcool – vor fi introduse în flacără, în poziţie oblică, dar numai cu vârful în jos, evitânduse astfel prelingerea alcoolului aprins, de-a lungul instrumentului şi, de acolo, pe mână.

Dimensionarea explantelor se va opera numai cu instrumentar flambat şi răcit la temperatura camerei; în caz contrar, temperatura ridicată a instrumentelor poate traumatiza celulele sau ţesuturile explantelor. Instrumentele tăioase, după introducerea lor în alcool, pentru flambare, vor fi trecute prin flacără – doar pentru o fracţiune de secundă – altfel se va deteriora tăişul acestora; în schimb, pensele, scapelele şi acele, vor fi menţinute în flacără, în cursul flambării, până la înroşirea vârfului lor.

3.3.2. Sterilizarea recipientelor de cultură şi dezinfectarea altor obiecte

Mediul de cultură se introduce numai în recipiente perfect curate şi *presterilizate*. Operaţiunea poartă denumirea de presterilizare deoarece – după porţionarea mediilor de cultură – flacoanele vor trece printr-o a doua etapă de sterilizare, o sterilizare umedă, prin autoclavare. Presterilizarea sticlăriei se face în etuve, *la sec*, prin *căldură uscată*, la temperatura de 160°C, timp de minimum trei ore, ştiut fiind faptul că există şi microorganisme sau spori termorezistenţi. Presterilizarea sticlăriei la temperaturi prea ridicate (în jur de 180°C, sau peste această temperatură), poate duce, în timp, la o degradare a calităţii sticlei şi, drept urmare, se poate ajunge – la un moment dat – la eliberarea din acestea, în mediile de cultură, a unor compuşi sau ioni care pot influenţa negativ vitroculturile, mai ales la sticla de proastă calitate.

În vederea sterilizării *la sec*, obiecte din sticlă cu care se lucrează în decursul operațiunilor de inoculare, altele decât recipientele de cultură, cum sunt: capsulele Petri, pipetele, lamele și lamelele de microscopie, nucile filtrante ș.a.m.d., dar și instrumentarul, vor fi ambalate în hârtie sau în folie de aluminiu, iar pachetele rezultate, vor fi așezate în tăvi metalice (sau în coșuri din sârmă) și astfel vor fi introduse în etuvă. Despachetarea lor se va face doar în perimetrul hotei sau al incintei aseptice.

Lavarea incorectă a sticlăriei poate conduce la producerea unor perturbații (uneori grave) în creșterea vitroculturilor, generând uneori, la nivelul inoculilor, manifestarea unor reacții particulare, inexplicabile, care cauzează erori interpretative și lipsa repetabilității unor rezultate.

Atunci când sticlăria este nouă, este de preferat să fie folosită abia după o prealabilă spălare și autoclavare a acesteia, autoclavarea operându-se cu flacoanele umplute cu apă; în acest mod, în momentul utilizării sticlăriei, în practicile curente, este preîntâmpinată trecerea unor ioni din sticlă, în mediile de cultură. În unitățile cu volum mare de inoculări, se recomandă spălarea mecanică a sticlăriei, întrucât prin aceasta crește operativitatea și calitatea muncii; în plus, în cazul spălării automate a sticlăriei, temperatura apei poate fi mult ridicată, fapt imposibil de realizat în cazul spălării manuale a sticlăriei. Spălarea automată a sticlăriei, în băi cu ultrasunete, asigură o perfectă curățire a recipientelor de cultură. Astfel de dispozitive sunt utilizate mai ales în unitățile cu volum mare de inoculări. Pentru a reduce costurile aferente forței de muncă, adeseori, în vitrocultură sunt utilizate flacoane din material plastic, de unică folosință, livrate sterile.

Tuburile și dopurile din cauciuc, sau din material plastic, termorezistent, după o prealabilă spălare, se fierb și abia apoi se sterilizează prin autoclavare, odată cu recipientele cu medii.

Dopurile din vată, cu care este de preferat să fie obturate recipientele de cultură, în momentul autoclavării lor, având în ele mediile de cultură, vor fi asepsizate odată cu recipientele. La prima autoclavare, unele dopuri de vată, ce conțin și fibre din material plastic, pot elimina substanțe care pot fi ușor toxice pentru inoculi. De aceea, în cazul efectuării unor experimente importante este recomandabil ca, prealabil utilizării, dopurile de vată să fie autoclavate și apoi, uscate. Dopurile din vată – provenite de la flacoane infectate – vor fi aruncate, ca de altfel și cele îmbibate accidental cu mediu de cultură. Dopurile de bumbac pot fi reutilizate, dar nu de prea multe ori.

Capacele metalice, foliile din aluminiu (dimensionate fiind), precum și bușoanele termorezistente, pot fi sterilizate în etuvă, *la sec*, ori prin autoclavare sau prin dezinfectare cu alcool 70^0.

Există o mare diversitate de recipiente de unică folosință, din material plastic, livrate sterile, cum ar fi: eprubete, capsule Petri, flacoane îmbușonate – de diferite forme și mărimi – recipiente de construcții speciale, vase de cultură etajate, nuci sau pâlnii filtrante, holdere cu placă filtrantă incorporată în ele etc. Asepsizarea acestora se face în industria de profil, fie prin iradiere cu radiații gamma (2000 r), fie prin mijloace chimice (cu oxid de etilenă sau de propilenă). În recipientele sterile, mediul de cultură – asepsizat în prealabil – va fi turnat în perimetrul hotei sterile, în condiții axenice.

Preîntâmpinarea producerii de infecții postasepsizare se realizează, în primul rând, printr-o corectă manipulare a recipientelor, incluzându-se în acest proces și faza de transport.

Asepsizarea *aparaturii* introduse în hota sterilă (stereomicroscop, lupă, sursa de lumină, plita electrică, agitator etc.) se va face prin ștergerea acesteia cu alcool etilic 70°; periodic, în decursul operațiunilor de inoculare, aparatura din hotă va fi reștearsă tot cu alcool etilic 70°.

3.3.3. Sterilizarea lichidelor, a apei și a mediilor de cultură

După preparare, mediile vor fi porționate în recipientele de cultură și acestea vor fi obturate în cel mai scurt timp, cu dopuri (preferabil, confecționate din vată înfășurată în tifon și consolidate cu ață) și apoi vor fi sterilizate, pentru ca mediul să nu fermenteze. Dopurile mari, confecționate din vată sintetică produc, uneori – după autoclavarea și răcirea apei sterile sau a mediilor lichide – pe fundul vaselor, formațiuni fibrilare, rezultate în urma recristalizării microfibrilelor de material sintetic, căzute din dopuri, motiv pentru care este de dorit ca – pe cât posibil – în vitrocultură să fie utilizate numai dopuri constituite din vată de bumbac. Dopul de vată trebuie să fie dens și să închidă bine flaconul. Recipientele cu o deschidere largă, obturate cu dopuri din vată, vor fi imobilizate pe gâtul flaconului prin învelirea dopului cu bucăți de tifon sau cu hârtie, fixate cu ață, sfoară, sau cu leucoplast, pentru a împiedica deschiderea accidentală a acestora pe parcursul diferitelor operațiuni de manipulare. Dacă vor fi utilizate recipiente care se închid cu capace – de forme și sisteme variate – acestea vor fi aplicate peste deschiderea recipientelor, de o așa manieră încât vasele să fie obturate, dar nu etanș, pentru ca să fie permis accesul nestânjenit al vaporilor supraîncălziți (agentul sterilizant), în recipientele cu medii. În caz contrar, sterilizarea mediilor se va face defectuos.

Mediile de cultură și apa distilată, pentru sterilizare se recomandă să fie autoclavate la temperatura de 120°C, regim termic care corespunde cu

realizarea în incinta autoclavei a unei presiuni de 1 atmosferă. Timpul de menținere a recipientelor în autoclavă va depinde de volumul lichidului sau a mediilor de cultură din interiorul recipientelor. În general, durata minimă de autoclavare este de circa 15 minute; cel mai frecvent, autoclavarea nu depășește 20-30 de minute (vezi tabelul 2). În cazul în care se utilizează medii de cultură care conțin ingrediente termolabile (mediul fiind porționat în cantități de maximum 75 ml/vas de cultură), se recomandă sterilizarea recipientelor cu medii la temperatura de 120°C, timp de 20 minute.

Tabelul 2. Recomandări privind durata minimă de sterilizare în autoclavă a recipientelor cu medii de cultură, în volume variabile (după *Biondi* și *Thorpe*, 1981)

Volum mediu/recipient (în ml)	Durata sterilizării la temperatura de 120°C (în minute)
20 – 50	15
75	20
250 – 500	25
1000	30
1500	35
2000	40

Substanțele termolabile (unele vitamine: piridoxina, tiamina, sau fitohormonii: giberelina, acidul 3 indolilacetic, zeatina, ori aminoacizii sau ureea) este recomandabil să fie adăugate mediului de bază – sterilizat în prealabil prin autoclavare – asepsizate fiind prin filtrare, filtrarea făcându-se prin trecerea soluției respective (de regulă, de ordinul a câțiva mililitri), printr-un filtru bacteriologic, așa cum sunt cele produse de firma Millipor.

În cazul în care mediile de cultură conțin compuși termolabili (în lipsa posibilității sterilizării lor prin filtrare), chiar și volume de 3-5 litri pot fi sterilizate în autoclavă, la temperatura de numai 115°C, timp de 60 de minute, sterilizarea acestora repetându-se după 24 de ore.

În general, când în autoclavă, pentru sterilizare sunt introduse vase umplute mai mult de ¾ din capacitatea lor, există riscul explodării acestora, la finele procesului de autoclavare, dacă închiderea este prea etanșă, din cauza variațiilor de presiune suferite de aerul din interiorul lor; dacă vasele sunt închise cu dopuri de vată, nelegate, la purjarea vaporilor acestea pot să se mobilizeze și să dezobtureze gura flacoanelor.

Inoculările se operează abia după răcirea mediilor de cultură.

Supraautoclavarea mediilor de cultură conduce la o alterare a calităților acestora, în primul rând din cauza deteriorării echilibrului ionic din medii şi, în al doilea rând, din cauza afectării capacității de solidificare a agarului, care în urma unei supraautoclavări nu se mai solidifică; o a treia consecință a depăşirii temperaturii la autoclavare constă în caramelizarea zaharozei din mediile de cultură. În schimb, subautoclavarea mediilor duce – la câteva zile de la autoclavare – la dezvoltarea în profunzimea acestora a unor colonii de microorganisme, în mediile agarizate ele fiind prezente sub forma unor mici lentile, iar în mediile lichide infecțiile mărind turbiditatea acestora; alteori, infecțiile apar numai pe suprafața mediilor de cultură nu şi în profunzime. Mediile infectate sunt inutilizabile. Când există dubii asupra eficienței autoclavării, putem menține recipientele cu medii, timp de câteva zile, la temperatura laboratorului, sau, pentru grăbirea proliferării germenilor infestanți se trec culturile într-o etuvă reglată la temperatura de $+37^0$C, timp de 2-3 zile. Mediile incorect sterilizate, trecute în regim termic optim pentru germinarea sporilor, vor fi invadate de microorganisme, ceea ce le face inutilizabile.

În cazul în care nu dispunem de o autoclavă, pentru sterilizarea umedă pot fi utilizate şi oalele de fiert sub presiune, tip kuktă, cu capacitatea de 8-10 l. În kuktă, pot fi introduse vase *Erlenmeyer*, eprubete şi flacoane variate, în care mediul de cultură nu trebuie să ocupe mai mult de o treime din volumul acestora. Flacoanele cu medii vor fi închise cu dopuri din vată, peste care este bine să fie aplicate bucăți de hârtie perforată sau de tifon, care să fie imobilizate de gâtul vasului cu ață sau cu sfoară. Pentru sterilizare, într-o kuktă de 10 l, se va introduce cca. 1 l de apă (cantitate care va varia în funcție de capacitatea kuktei şi de gradul de umplere a acesteia cu recipiente), astfel încât, după închidere, în interiorul ei să existe un strat suficient de apă care să asigure formarea de vapori; în kuktă, recipientele trebuie să fie imobilizate, pentru a nu se răsturna în timpul fierberii; totodată, se va verifica dacă supapa de purjare, montată în capac, nu este blocată. Durata sterilizării recipientelor cu medii, în oala de fiert sub presiune, va fi de 15-25 de minute, din momentul declanşării emisiei de vapori, prin supapa de purjare. Deschiderea kuktei se va face numai după răcirea ei, respectiv după depresurizarea acesteia; în caz contrar, există pericolul producerii de accidente, precum şi de mobilizare a dopurilor cu care au fost obturate recipientele de cultură. Vasele de mare capacitate, care conțin mediul destinat spre a fi repartizat în flacoanele de cultură (în prealabil sterilizate la *sec*), vor fi scoase din kuktă (prin prindere cu ajutorul unei mănuşi

protectoare, preferabil sterile, sau cu manşon confecţionat dintr-un material gros), şi fierbinţi fiind vor fi trecute în hota aseptică. Pentru a se evita solidificarea agaragarului din mediu, pe durata operaţiunilor de porţionare a mediului este bine ca vasul, în hotă fiind, să fie aşezat pe o plită electrică, adusă la temperatura de 40°C (eventual prevăzută şi cu agitator magnetic, agitator care – înainte de introducerea în vas – trebuie sterilizat prin una din metodele cunoscute). Porţionarea mediului de cultură, în recipientele presterilizate şi instalate în prealabil în hotă, se poate face manual, semimanual sau automat, după posibilităţi. Imediat după proporţionarea mediului, acestea vor fi obturate cu dopuri sterile.

Mediile de cultură lichide pot fi sterilizate şi "*la rece*", prin filtrare, utilizând fie nuci filtrante (din sticlă sau din porţelan, cu porozitate de 0,22 microni), fie filtre Millipor, de mai mare sau mai mică capacitate. Nucile filtrante sau holderele, în care se montează filtrele Millipor, vor fi sterilizate prin autoclavare, înfăşurate fiind în folie de aluminiu.

Filtrele Millipor sunt discoidale, au mărimi variate şi prezintă o porozitate cuprinsă între 0,5-0,22 microni, fapt care asigură reţinerea – la nivelul lor – chiar şi a particulelor virale. Filtrele Millipor sunt livrate fie sub formă de seturi de pelicule, fie peliculele filtrante se află încapsulate în carcase filtrante, din material plastic, care asigură sterilizarea unui număr limitat de mililitri; aceste seturi sunt livrate sterile şi sunt de unică folosinţă; unele tipuri de filtre sunt "bicamerale", fiind prevăzute – în porţiunea lor inferioară – cu un vas colector, racordabil la trompa de vid, ceea ce face ca prin aspiraţie filtrarea să se facă mai rapid. Holderele de mici dimensiuni, cu filtrul Millipor detaşabil sau încorporat în ele, se racordează la seringi, filtrarea făcându-se prin presarea mediului cu pistonul seringii, astfel încât lichidul să străbată pelicula filtrantă, mediul filtrat colectându-se într-un recipient steril. În cazul holderelor de dimensiuni mai mari, de exemplu a celor cu un diametru de peste 10 cm, trecerea mediului lichid prin pelicula filtrantă se va face prin aspirare, vasul colector – sterilizat în prealabil – urmând să fie prevăzut cu tubulatură laterală, pentru racordarea acestuia la o instalaţie de vidare. Cantitatea de lichid posibil de sterilizat printr-o peliculă Millipor va depinde de mărimea filtrului; după utilizare, filtrele Millipor vor fi aruncate. Sterilizarea holderelor de material plastic termorezistent, sau a celor metalice, cu filtrul Millipor încorporat în ele, se va face cu prudenţă, prin autoclavare, fără depăşirea temperaturii de 121°C, deoarece temperaturile crescute pot deteriora calitatea filtrelor.

Asepsizarea "*la rece*" a substanţelor termolabile, solubile în solvenţi organici, se poate face şi prin dizolvarea lor într-o cantitate mică de alcool,

eter etilic sau acetonă (dizolvanți care se evaporă ușor, eterul etilic evaporându-se la temperatura de 30°C); substanța solubilizată în dizolvant va fi încorporată, în condiții axenice, în mediu asepsizat în prealabil, după diluarea ei cu apă bidistilată, sterilă. O practică mai puțin uzitată constă în introducerea în mediile de cultură a unor substanțe dezinfectante, cum sunt: *oxidul de propilenă* (1 ml la 200 ml de mediu, acesta împiedicând dezvoltarea ciupercilor și a bacteriilor), ori a *antibioticelor* (penicilină, streptomicină sau a cloramfenicolului), caz în care există însă riscul ca acestea să provoace mutații și să determine o inhibare a organogenezei, sau chiar stoparea acesteia; în plus, s-a înregistrat o reducere a capacității adaptative a vitroplantulelor generate pe medii cu adaos de antibiotice, în momentul transferării lor *ex vitro*.

O altă categorie de compuși, cu acțiune bacteriostatică puternică, sunt *sulfamidele*, dar acestea sunt utilizate foarte rar ca adaosuri la mediile destinate vitroculturilor vegetale.

În pregătirea materialului vegetal, în vederea prelevării de explante, este indispensabilă utilizarea *apei sterile*. Cel mai obișnuit, sterilizarea apei se face prin fierbere sau prin autoclavare.

3.3.4. Asepsizarea materialului vegetal

Materialul vegetal din care vor fi prelevate explante, atunci când acesta provine din mediul septic, trebuie asepsizat. Asepsizarea acestuia se realizează numai cu agenți chimici, a căror eficiență poate fi sporită printr-o ultrasonicare sau vidare ușoară, de scurtă durată, a flacoanelor cu soluția dezinfectantă în care se află cufundate fragmentele vegetale.

Proveniența materialului vegetal (înțelegând prin proveniență atât *specia*, cât și *cadrul ecologic* din care derivă planta, *organul*, *țesutul*, *amplasamentul* lor în plantă – superficial sau mai în profunzime – *vârsta*, *fenofaza* etc.) ridică probleme speciale, atunci când trebuie să adoptăm o anumită procedură de asepsizare, legat de potențiala încărcătura cu germeni a acestuia, natura și gradul lor de aderență la suprafața de contact, respectiv la nivelul plantei sau a organelor acesteia. În consecință, există o multitudine de factori care trebuie avuți în vedere atunci când sunt adoptate procedurile de dezinfecție ale materialului biologic, considerate ca fiind cele mai eficiente, potrivite pentru asepsizarea unui anumit tip de material vegetal, donatoar de explante, având pilozitate variată, suprafață gofrată, pliată, virgată, mineralizată etc.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE

Selectarea procedeului de asepsizare, compusul ales pentru sterilizare, concentrația soluției și durata ei de acționare, se va face în funcție de calitatea materialului vegetal, frăgezimea lui, cutinizarea sau cerificarea epidermei acestuia etc., apreciindu-se arbitrar gradul de penetrare a dezinfectantului în profunzimea țesuturilor, estimări făcute fie subiectiv, fie în urma unor tatonări prealabile, evaluându-se gradul de infestare a vitroculturilor postinoculare, precum și după aprecierea procentului de viabilitate înregistrat după dezinfectarea, dimensionarea, inocularea și incubarea cormofito-inoculilor. De regulă, organele subterane – sau cele care provin din apropierea solului – sunt purtătoare de numeroși germeni (paraziți, simbionți sau saprofiți, ori de spori ai acestora), ceea ce face ca sterilizarea lor, uneori, să ridice probleme deosebite. Mugurii, tulpinile, respectiv ramurile cu lenticele, precum și organele cu pilozitate ridicată, prezintă incovenientul aderării sporilor și a germenilor la nivelul formațiunilor epidermale, sau a rugozităților de pe suprafața organelor, particularități morfoanatomice care crează serioase impedimente în realizarea unei corespunzătoare asepsizări a materialului vegetal, cu atât mai mult cu cât, în momentul cufundării acestora în lichidul dezinfectant, între suprafața epidermei și soluția sterilizantă se poate interpune un strat de aer, peliculă care împiedică accesul direct al dezinfectantului la suprafața epidermei, pe întreaga întindere a acesteia. Pentru a micșora tensiunea superficială, în lichidul dezinfectant, se recomandă adăugarea câtorva picături de Tween (20 sau 80), ori a unui detergent, măsură prin care se preîntâmpină formarea "filmului de aer", peliculă interpusă între materialul biologic și soluția dezinfectantă, facilitându-se astfel contactul direct al agentului asepsizant cu suprafața epidermei organelor.

Soluția dezinfectantă trebuie să fie suficient de puternică pentru ca aceasta, în scurt timp, să distrugă toate microorganismele aderente la suprafața materialului vegetal, fără ca prin toxicitatea sa ea să distrugă țesuturile viitorilor inoculi, din cauza penetrării agentului asepsizant în profunzimea lor, provocând necroze la nivelul potențialelor explante. Pe de altă parte, agentul dezinfectant trebuie să poată fi îndepărtat cu ușurință de pe suprafața materialului biologic donator de explante, fie prin clătiri succesive ale acestuia cu apă distilată, sterilă, fie – în cazul dezinfectanților cu clor – prin spălarea repetată a materialului vegetal cu apa sterilă, ușor acidulată, pentru îndepărtarea clorului (agentul dezinfectant al acestor soluții). În caz contrar, după inoculare, agentul asepsizant remanent pe explante poate împiedica declanșarea proceselor regenerative la nivelul inoculilor, periclitând chiar viața acestora.

Dezinfectanții asigură, însă, doar o sterilizare de suprafață a materialului bioloic donator de explante. Uneori, nenumărate bacterii, virusuri, micoplasme şi fungi, se află localizate în țesuturile din profunzimea organelor, ceea ce ridică probleme deosebite în ceea ce priveşte depistarea şi prevenirea erupției lor externe, unele infecții apărând abia după al 2-lea ori al 3-lea pasaj (îndeosebi la explantele care provin de la specii lemnoase), întrucât unele microorganisme se mențin active sau latente, în celulele ori în spațiile intercelulare din țesuturile profunde ale cormofitoinoculilor, fără ca acestea să poată fi puse în evidență, în primele etape de vitrocultură.

La unele plante, cu pilozitate ridicată (cum este muşcata, respectiv *Pelargonium* sp.), în momentul inițierii vitroculturilor se impune luarea unor măsuri speciale de dezinfectare, şi anume: pentru început, materialul vegetal trebuie îmbăiat în alcool etilic 96°; apoi, fragmentul va fi trecut rapid prin flacără şi arzând va fi plonjat în apă sterilă. Pentru prevenirea manifestării infecțiilor bacteriene, prezente în țesuturile profunde, este indispensabilă adăugarea de antibiotice în mediile de cultură. În cazul în care astfel de infecții se manifestă dezvoltarea acestora va fi anihilată de antibioticul prezent în mediu, suprimând dezvoltarea bacteriilor. De menționat este faptul că, infecțiile latente, existente în țesuturile profunde ale inoculilor, reduc capacitatea organogenă a culturilor. În alte situații, atunci când meristemele caulinare – apicale sau axilare – sunt slab protejate la exterior, de către învelişurile mugurilor (de exemplu la hortensie sau la unele soiuri de cartof), explantele meristematice pot rămâne puternic infestate cu germeni, chiar şi după sterilizări repetate. În astfel de cazuri, se apreciază că, după inoculare numai cca 40% dintre vitroculturi se dovedesc a fi libere de infecții.

Un dezinfectant cu acțiune rapidă şi eficientă este alcoolul etilic, în concentrații de: 70°, 96° sau chiar ca alcool absolut. Dar, nu trebuie scăpat din vedere faptul că, alcoolul este un puternic liposolubilizant şi un coagulant proteic. Ca atare, alcoolul etilic – ca asepsizant al suprafețelor materialului biologic – va fi utilizat cu multă prudență şi doar la organele sau fragmentele de organe foarte piloase, ori care dețin o epidermă puternic cutinizată sau cerificată, ori la muguri foarte bine închişi. În astfel de cazuri, materialul biologic trebuie plonjat – timp de 30-60 de secunde – în alcool etilic, concentrat, după care fragmentele sau organele supuse dezinfectării vor fi introduse rapid în apă sterilă. Pentru creşterea eficienței metodelor de îndepărtare a germenilor aderenți la suprafața materialului vegetal (uneori chiar pentru a provoca germinarea sporilor), adeseori se indică o spălare a fragmentelor vegetale (introduse fiind în săculețe din tifon), un timp, sub un jet de apă (amplasând săculețe direct sub robinet), ori o clătire a acestora cu

soluții de detergenți dezinfectanți (de exemplu cu *Domestos*), după care se va proceda la scufundarea materialului biologic în soluțiile clasice de sterilizare. După spălarea în apă a materialului biologic (presupus ca fiind puternic încărcat cu germeni), acesta va fi aseptizat printr-una din procedurile obișnuite; trebuie să se aibă în vedere și faptul că există tipuri de țesuturi sensibile la anaerobioza cauzată de o submersie prelungită în apă a fragmentelor donatoare de explante, un exemplu oferindu-l apexurile caulinare de crizanteme, care trecute printr-o asemenea soluție, după inoculare, pot să se necrozeze rapid (*Cachiță*, observații personale); alte tipuri de materiale vegetale sunt sensibile la temperatura scăzută a apei de robinet, situații care necesită o urmărire atentă a reacțiilor explantelor după primele testări și luarea de măsuri, în consecință. După spălare, poate urma o cufundare a materialului vegetal în alcool etilic (cu sau fără spălarea acestuia, post-tratament cu alcool, în apă distilată, sterilă); în continuare, adeseori, materialul biologic poate necesita și parcurgerea altor etape de dezinfecție, caz în care se va utiliza unul dintre agenții sterilizanți clasici (vezi tabelul 3), folosit într-o concentrație care să fie eficientă ca asepsizant, fără să dăuneze țesuturilor, mai ales la fragmentele care au fost tratate deja cu alcool etilic, procedură care poate sensibiliza materialul vegetal, la aplicarea altor tratamente.

Cea mai comună procedură de asepsizare a materialului vegetal este aceea care utilizează soluții diluate de *hipoclorit de calciu* sau de *natriu* (apă de Javel), administrate în concentrații variate, în funcție de natura și originea organelor sau a fragmentelor. De regulă, în soluția dezinfectantă sunt submersate fragmente mai mari ca dimensiune, în raport cu viitorul sau viitoarele explante ce trebuie prelevate din acestea, întrucât, în decursul asepsizării o parte dintre celulele materialului biologic pot să se necrozeze, zone care, în momentul explantării cormofitoinoculilor, trebuie înlăturate.

În general, hipocloritul de natriu comercial are cca 15-20% clor activ; atât soluțiile comerciale preparate pe bază de clor (Clorox, Domestos), cât și soluțiile de hipoclorit de natriu ori de calciu, se recomandă a fi utilizate imediat după preparare, întrucât, în timp acestea se descompun ușor, mai ales atunci când sunt ținute în vase neacoperite, pierzându-și o parte din eficacitatea lor dezinfectantă.

Tabelul 3. Eficacitatea asepsizantă a unora dintre agenţii chimici, sterilizanţi, utilizaţi în dezinfectarea *materialelor biologice*, destinate culturilor de ţesuturi şi celule vegetale (după *Street*, 1973)

Compusul chimic	Concentraţii utilizate	Uşurinţă de înlăturare	Durata sterilizării (minute)	Eficacitate
Hipoclorit de calciu	9 – 10%	+++	5 – 30	f. bună
Hipoclorit de natriu	2 – 5%	+++	5 – 30	f. bună
Apă oxigenată	10 – 12%	+++++	5 – 15	bună
Apă bromată	1 – 2%	+	2 – 10	f. bună
Azotat de argint	1%	+	5 – 30	bună
Clorură mercurică	0,1 – 1%	+	2 – 10	satisfăcătoare
Antibiotice	4 – 50 mg/l	++	30 – 60	destul de bună

În scopul asepsizării materialului vegetal, soluţiile de hipoclorit vor fi utilizate, cu precădere, în concentraţii de 1-8%. Trebuie să subliniem faptul că, spre deosebire de hipocloritul de natriu, care lichid fiind se depreciază uşor (chiar dacă recipientele sunt închise ermetic şi sunt depozitate la rece), hipocloritul de calciu solid (comercializat sub formă de granule sau pulbere), este mult mai stabil în timp. Prin utilizarea soluţiilor de hipoclorit de calciu, proaspăt preparate, operatorul va avea certitudinea eficacităţii asepsizante a acestora şi reproductibilitatea procedurii de dezinfectare, la concentraţia dorită. Întrucât hipocloritul de calciu se dizolvă lent, pentru grăbirea solubilizării lui se recomandă amestecarea periodică a soluţiei, cu o baghetă din sticlă; în final, soluţia trebuie filtrată prin vată, sau printr-o hârtie de filtru cu pori mari, deoarece particulele de hipoclorit de calciu, nedizolvate, în decursul operaţiunii de dezinfectare ale materialului vegetal se pot sedimenta, provoacând o necrozare a ţesuturilor pe care acestea se depun.

Pe măsură ce soluţiile dezinfectante, pe bază de clor activ, acţionează, ele cauzează o albire a zonelor care au fost lezate (de exemplu prin tăiere sau înţepare), fapt care constituie o dovadă a eficacităţii lor. După constatarea acestui fenomen, se poate considera că asepsizarea a reuşit şi, în consecinţă, se va putea trece la decantarea dezinfectantului, iar peste materialul vegetal se va turna un strat de apă distilată, sterilă. Repetata spălare cu apă distilată, sterilă, a materialului vegetal (în aproximativ cinci băi succesive, a câte 10-15 minute fiecare), constituie o măsură benefică, strict necesară, eficientă şi suficientă pentru îndepărtarea de pe acesta a resturilor de soluţie dezinfectantă. Atât în cursul sterilizării, cât şi în cel al spălării, din timp în timp, flacoanele ce conţin soluţia dezinfectantă şi materialul vegetal vor trebui agitate.

După cum rezultă din tabelul 3, alături de alcoolul etilic și de soluțiile de hipoclorit, există și alte tipuri de substanțe dezinfectante, care însă sunt utilizate mai rar în practicile curente, fie pentru că dețin o eficacitate asepsizantă mai scăzută (cum este cazul apei bromate), fie că prezintă un pericol toxic pentru operator și un prea mare risc de poluare – cum este în cazul soluțiilor de clorură mercurică – a mediului ambiant, în momentul deșertării ei în sistemul de canalizare.

Semințele, cel mai adesea, se recomandă să fie sterilizate fie prin introducerea lor în alcool etilic (absolut), fie prin tratarea acestora cu o soluție de clorură mercurică 0,25%, administrată timp de 6 ore, fie în concentrație de 0,5%, aplicată timp de 1-3 ore. Imersarea materialului vegetal într-o soluție de antibiotice (de exemplu, amestec de penicilină cu streptomicină, ambele în concentrație de 1 mg/l), timp de 2 ore, după aplicarea unui tratament prealabil cu o soluție de hipoclorit, mărește eficacitatea sterilizantă a procedurii (vezi *Margara*, 1982).

Cu rezultate bune, pot fi utilizate și soluțiile de clorură de var (de uz sanitar), cloramină, permanganat de potasiu, perhidrol (apa oxigenată 30%), și altele.

Numai prin tatonări repetate vor putea fi adoptate cele mai eficiente metode de sterilizare, corespunzătoare diferitelor tipuri de materiale vegetale (organe sau fragmente de organe) (vezi tabelul 4). Procedurile și durata administrării unor tratamente asepsizante, cu un anumit agent dezinfectant, variază mult și în funcție de *sezon*, de faza de vegetație în care s-au aflat plantele mame sau organele acestora, donatoare de explante, *natura* și *originea* materialului biologic, *regimul pluviometric* din zona din care provine acesta (cât mai apropiată momentului recoltării), *modul de udare* a plantelor mame (când ele sunt recoltate din spații protejate) este la ghiveci, respectiv la baza tulpinilor, evitându-se stropirea masei foliare etc. Plantele care provin din teren, alese să devină donatoare de explante, dacă este posibil, din timp, este bine să fie acoperite cu pungi din material plastic, transparent, pentru a le feri de o prea mare încărcare cu germeni.

Uneori, este necesar ca în decursul procedurilor de asepsizare, vasul cu soluția dezinfectantă, având amplasat în aceasta materialul biologic, să fie racordat – pentru o scurtă perioadă de timp – la o instalație de vidare, pentru ca, în acest mod, să se realizeze o îndepărtare a peliculei de aer interpusă între agentul asepsizant și materialul biologic, facilitându-se astfel accesul soluției sterilizante până în straturile subepidermale, ori în toate pliurile sau ornamentațiile epidermei, ori a țesuturilor externe prezente la nivelul organelor ori a fragmentelor supuse tratamentului asepsizant.

Tabelul 4. Proceduri de sterilizare ale materialului vegetal (după *Street*, 1973)

Tip material vegetal	Presterilizare	Sterilizare	Poststerilizare	Utilizare	Observaţii
Seminţe	Submersare în alcool etilic absolut 10 sec; apoi, spălare în apă distilată, sterilă	Seminţe (cu tegumentul integru) se submersează în hipoclorit de Ca sau de Na 10%, 20-30 minute, sau în apă bromată 1%, timp de 5 minute, fie în $HgCl_2$ 0,1-1% timp de 5-10 minute, ori în H_2O_2 15-30% timp de 10-20 minute; sau în fenol 5%	Seminţele se spală de 5 ori în apă sterilă şi se germinează pe hârtie de filtru sterilă, umectată cu apă, sau pe mediu constând din apă cu 6 g/l agar, mediu sterilizat prin autoclavare	Rădăcinişe, pentru cultura de rădăcini; părţi din plantulă, pentru cultură de calus, muguraşi şi organe cu regenerare de neoplantule	Pentru prelevare de embrioni zigotici ori de endosperm se îndepărtează tegumentul
Fragmente de tulpină	Spalare apă curgătoare şi clătire în alcool etilic absolut	Imersarea fragmentelor 15-30 minute în 2-5% hipoclorit de Ca sau Na (după caz, conc. de până la 10%) ori în 15% H_2O_2, timp de 1 oră	Se spală de 3 ori în apă sterilă	Se pot folosi pentru iniţiere cultură de calus sau pentru geneză de neoplantule	De regulă, se recomandă respectarea polarităţii naturale sau se inoculează paralel cu suprafaţa mediului
Frunze	Ştergerea suprafaţei cu alcool etilic absolut	Se imersează cca 1 minut, în $HgCl_2$ 0,1%	Se spală repede în apă sterilă; se schimbă cca 5 ape; se tamponează suprafaţa cu hârtie de filtru sterilă	Iniţiere cultură de calus; mai greu diferenţiază neoplantule (este oportună prezenţa nervurii principale)	Sunt greu de sterilizat, se necrozează uşor, la inoculare se amplasează cu lamina paralel cu mediu, sau se împlântă în mediu
Flori (boboci, inflorescenţe, peduncul, rahis)	Imersare timp de 1 minut în alcool etilic 70-90°	Se imersează 15-20 minute în hipoclorit de Ca sau de Na 2-5%	Se spală repede în apă sterilă; se schimbă cca 5 ape, de 5 ori	Iniţiere cultură antere; multiplicare şi propagare, iniţiere calus	Pot fi utilizate întregi, sau secţionate ori pot fi folosite componentele separate
Fructe	Clătire în alcool etilic absolut	Se submersează 10 minute în 2% hipoclorit de Ca sau de Na	Se spală repede în apă sterilă, se extirpă seminţele sau alte ţesuturi ce interesează	Cultura de ovule sau de componente ovariene	Se pot fertiliza ovule *in vitro*, se poate urmări dezvoltarea lor (bumbac); sursă bună de plantule sterile
Organe de rezervă	Se spală prin frecare, în apă curgătoare	Se submersează 20-30 minute în 2% hipoclorit de Ca sau de Na	Se spală bine de 3 ori, în apă sterilă	Cultură de calus, neogeneză de plantule	Pentru prelevare de explante se îndepărtează tegumentele

Beauchesne (1980), la hortensie, a reuşit să obţină un procent de 40% inoculi meristematici (caulinari) aseptici, numai dacă a procedat, pentru început, la o spălare a apexurilor cu un dezinfectant chirurgical, după care a urmat o trecere a materialului vegetal într-o soluţie de clorură mercurică, operaţiune succedată de o clătire a acestuia în alcool etilic, urmată de o submersie a lui – timp de 20 de minute – într-o soluţie de hipoclorit de calciu 4%.

Seminţele sâmburoase, se recomandă să fie imersate într-o soluţie de hipoclorit de calciu 5%, timp de 10 ore, după care – în hota cu flux laminar de aer steril – se va proceda la îndepărtarea învelişurilor seminale şi, apoi, se va trece la dezinfectarea propriu-zisă a embrionilor, timp de 30 de minute, prin cufundarea acestora într-o soluţie de hipoclorit.

În unele cazuri, de exemplu a vârfurilor vegetative de plante tinere, erbacee (atunci când acestea provin din teren şi prezintă o puternică încăr-

cătură cu germeni) necesită o dublă sau triplă sterilizare. În astfel de situații, într-o primă etapă de dezinfecție se va proceda la scufundarea apexurilor într-o soluție de hipoclorit de natriu (cu 0,28% clor activ), timp de 10 minute, după care va urma o spălare repetată a materialului biologic cu apă sterilă; apoi, apexuri de cca 2 mm vor fi prelevate și vor fi inoculate pe medii aseptice (având în compoziție doar macroelemente MS, microelemente *Heller*, zaharoză și agar); culturile realizate vor fi incubate timp de 48 de ore, la o temperatură de 24°C, după care va urma o a doua operațiune de dezinfecție, cu o soluție de hipoclorit de natriu 0,42%, timp de o oră, scoși fiind din recipientele de cultură; operațiunea va fi urmată de spălarea apexurilor – de repetate ori – cu apă sterilă, după care acestea vor fi definitiv inoculate, pe medii de cultură aseptice potrivite unei evoluții optime a acestora, în vitrocultură. În acest mod, procentul de reușită în obținerea de culturi aseptice poate fi de aproximativ 90%.

3.4. MEDII DE CULTURĂ

În general, mediile de cultură pot fi *lichide*, *semisolide* sau *solide*. Compușii chimici care intră în alcătuirea mediilor de cultură sunt atât de natură *anorganică* (apă și săruri minerale, respectiv macro- și microelemente), cât și de natură *organică*, în principal: glucide, vitamine, regulatori de creștere, agar, și altele.

În tabelele 5-8 sunt prezentate elementele și compușii chimici, precum și concentrațiile frecvent utilizate în prepararea mediilor de cultură.

În selectarea unui mediu de cultură, potrivit pentru creșterea *in vitro* a anumitor tipuri de cormofitoinoculi, nu trebuie să se procedeze empiric, ci în funcție de *tipul* de explant, de *modul* de cultură, de *proveniența* acestuia, de *sezonul* în care se face prelevarea și inocularea explantelor (mai ales în cazul în care organele, mugurașii sau embrionii se află în stare de repaus) și de *scopul* urmărit, pe baza cunoașterii recomandărilor din literatura de specialitate, se va opta pentru alegerea celei mai echilibrate compoziții de mediu, care să asigure o evoluție corespunzătoare a vitroculturilor. Dacă în literatura de specialitate nu există recomandări referitoare la cultivarea *in vitro* a speciei sau a tipului de explant cu care urmează să lucrăm, este bine să se facă tatonări, urmărindu-se evoluția, în vitrocultură, a câtorva dintre explantele în cauză, pe principalele medii de cultură, devenite clasice, asigurând inoculilor o anumită balanță hormonală, sau pe un singur tip de mediu (de exemplu *Murashige-Skoog*, 1962), organizându-se mai multe variante în ceea ce privește concentrațiile diferitelor auxine ori citochinine, administrate

singure sau în amestec, în proporții variate. În funcție de reacțiile înregistrate, se vor stabili variantele de medii care prezintă interes pentru un anumit tip de experiment și se va alege calea pe care se va merge, în continuare.

Sărurile minerale, dizolvate fiind în apă, se regăsesc în mediul de cultură sub formă de *ioni*. Aceştia vor fi absorbiți selectiv de către variatele tipuri de cormofitoinoculi, ceea ce duce – după o anumită perioadă de cultură – la schimbarea raportul ionic din mediu, dezechilibru care poate influența negativ multiplicarea celulelor şi creşterea culturilor, ori procesele de organogeneză şi de embriogeneză. Nu trebuie scăpat din vedere nici faptul că *presiunea osmotică* a mediului de cultură este influențată nu numai de natura şi concentrația glucidelor solubile din mediu, ci şi de concentrația ionică, totală, a acestuia.

Mediile de cultură abia după autoclavare dobândesc calitățile care le caracterizează proprietățile necesare asigurării creşterii optime a variatelor tipuri de explante sau inoculi. Sterilizarea mediilor de cultură lichide, prin filtrare, face ca acestea să dețină calități diferite – într-o oarecare măsură – de omoloagele lor asepsizate prin autoclavare.

Mediile de cultură se prepară din substanțe cu grad ridicat de puritate (p.a.). Dacă nu dispunem de săruri minerale cu specificația p.a., mediile rezultate nu numai că nu vor corespunde asigurării unei bune evoluții a cormofitoinoculilor, fiind dezechilibrate ionic, ci ionii impurificatori, mai ales în mediile lichide, în amestecul final (după autoclavare), pot cauza formarea de precipitate, care se depun pe fundul vaselor sub formă de cruste insolubile.

Natura elementelor chimice indispensabile creşterii explantelor vegetale cultivate pe medii aseptice, concentrația lor şi compuşii sub care ele trebuie să se găsească în substratul de cultură, sunt particularități care au fost stabilite pe baza cercetărilor efectuate în decursul timpului, de către specialiştii din domeniul nutriției plantelor (studii privind compoziția cenuşei vegetale, a sevei brute şi a celei elaborate, care circulă prin sistemul conducător al plantelor), a studiilor referitoare la absorbția şi desorbția selectivă a ionilor (în natură, în culturi hidroponice, sau *in vitro*), schimburile ionice (petrecute la nivelul rădăcinilor ori a celulelor vitroculturilor), nutriția extraradiculară etc. O contribuție importantă la aceste studii au adus şi experimentele de testare a reacției diferitelor tipuri de inoculi, în condițiile cultivării lor pe variate medii de cultură, normale sau cu exces de ioni ori, dimpotrivă, carențate în anumite elemente chimice.

Pentru cultivarea *in vitro* a diferitelor tipuri de cormofitoinoculi, există numeroase recomandări cu privire la medii de cultură posibil de utili-

zat în variate scopuri. Astfel, pentru cultura de *calus* sunt recomandate mediile: *Gamborg* şi colaboratorii (B5)(1968), *Gautheret*, (1948), *Heller*, (1953), şi *Murashige – Skoog* (MS) (1962); în schimb, pentru cultura de *rădăcini* este mai potrivit mediul *White* (1945; 1953), iar pentru vitrocultura a variate *organe* sau fragmente de organe sunt utile mediile B5 şi MS, în timp ce, pentru cultura de *antere* este recomandat mediul *Nitsch* (1972) (tabelul 5) şi altele.

3.4.1. Compuşii utilizaţi în prepararea mediilor de cultură destinate vitroculturilor vegetale

3.4.1.1. Compuşii *anorganici*

3.4.1.1.1. *Apa*

Viaţa este de neconceput în lipsa apei, ea fiind cel mai important şi răspândit compus chimic din materia vie. Pierderea apei din celule, prin deshidratare, din cauza uscăciunii sau pe cale osmotică (în situaţia în care explantele sunt introduse într-o soluţie hipertonică), afectează puternic metabolismul celular şi viaţa acestora. Persistenţa unei astfel de situaţii conduce, într-o primă etapă, la pierderea turgescenţei celulelor, iar prelungirea ei devine incompatibilă cu buna desfăşurare a proceselor vitale. Dezechilibrarea hidrică, severă, a celulelor explantelor, prealabil inoculării, sau a celulelor inoculilor aflaţi în vitrocultură, pune materialul biologic în imposibilitate funcţională, chiar şi după reechilibrarea deficitului celulelor acestuia, în apă. De aceea, pe parcursul operaţiunilor de prelevare a explantelor şi a inoculării lor *in vitro*, sau pe durata vitroculturii, trebuie să fie evitată deshidratarea severă a celulelor şi ţesuturilor, respectiv veştejirea acestora; dezechilibrarea osmotică a mediilor în care sunt introduşi cormofitoinoculii, în raport cu presiunea osmotică a sucului celular al acestora, altfel spus deshidratarea prin şoc osmotic, poate influenţa negativ, chiar radical, evoluţia cormofitoinoculilor aflaţi în vitrocultură. Introducerea explantelor în medii hipertonice, sau dezechilibrarea osmotică – în timp – a mediilor lichide, în suspensiile de celule ori a celor de protoplaşti, provoacă o pierdere rapidă a apei din celule, prin *exosmoză*, ele suferind un proces de *plasmoliză*. În cazul producerii unor accidente de acest tip, trecerea imediată a celulelor într-o soluţie cu o concentraţie salină moderată (preferabil efectuată în câteva trepte de concentraţie, sau gradat), poate reechilibra starea osmotică a celulelor; introducerea directă a celulelor puternic plasmolizate,

Tabelul 5. Compoziția chimică unor medii de cultură mai frecvent utilizate (după *Bhojwani* și *Razdan*, 1983)

Constituenți	Medii (în mg/l)						
	White* (1963)	Heller* (1953)	MS* (1962)	ER* (1965)	B5* (1968)	N* (1969)	NT* (1971)
Anorganici							
NH_4NO_3	-	-	1650	1200	-	720	825
KNO_3	80	-	1900	1900	2527,5	950	950
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	-	75	440	440	150	-	220
$CaCl_2$	-	-	-	-	-	166	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	750	250	370	370	246,5	185	1233
KH_2PO_4	-	-	170	340	-	68	680
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	-	-	134	-	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	300	-	-	-	-	-	-
$NaNO_3$	-	600	-	-	-	-	-
Na_2SO_4	200	-	-	-	-	-	-
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	19	125	-	-	150	-	-
KCl	65	750	-	-	-	-	-
KI	0,75	0,01	0,83	-	0,75	-	0,83
H_3BO_3	1,5	1	6,2	0,63	3	10	6,2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	5	0,1	22,3	2,23	-	25	22,3
$MnSO_4 \cdot H_2O$	-	-	-	-	10	-	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	3	1	8,6	-	2	10	-
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	-	-	-	-	-	-	8,6
$ZnNa_2EDTA$	-	-	-	15	-	-	-
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	-	-	0,25	0,025	0,25	0,25	0,25
MoO_3	0,001	-	-	-	-	-	-
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,01	0,03	0,025	0,0025	0,025	0,025	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	-	-	0,025	0,0025	0,025	-	-
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	-	-	-	-	0,03
$AlCl_3$	-	0,03	-	-	-	-	-
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	-	0,03	-	-	-	-	-
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	-	1	-	-	-	-	-
$Fe_2(SO_4)_3$	2,5	-	-	-	-	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	27,8	27,8	-	27,8	27,8
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	-	-	37,3	37,3	-	37,3	37,3
Fe Sequestrenc 330	-	-	-	-	28	-	-
Organici							
Inozitol	-	-	100	-	100	100	100
Acid Nicotinic	0,05	-	0,5	0,5	1	5	-
Piridoxină HCl	0,01	-	0,5	0,5	1	0,5	-
Tiamină HCl	0,01	-	0,1	0,5	10	0,5	1
Glicină	3	-	2	2	-	2	-
Acid folic	-	-	-	-	-	0,5	-
Biotină	-	-	-	-	-	0,05	-
Zaharoză	2%	-	3%	4%	2%	2%	1%
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	12,7%

* MS – Murashige-Skoog; ER – Eriksson; B5 – Gamborg și colab.; N – Nitsch; NT – Nagata-Takebe. La aceste mediide bază nu sunt incluse amestecurile complexe nutriționale (extracte) sau cărbunele activ, și nici regulatorii de creștere.

BUAV CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în apă, poate provoca o *endosmoză* violentă, finalizată printr-o explodare a acestora. O plasmoliză de durată conduce la moartea celulelor. În consecință, mediile de cultură trebuie să fie, întotdeauna, foarte bine echilibrate ionic și osmotic.

În recipientele cu vitrocultură, apa suferă un „circuit" închis. În situația în care regimul termic din camerele de creștere este reglat necorespunzător, o parte din apa transpirată de cormofitoinoculi, sau cea evaporată din mediul de cultură, se condensează pe pereții recipientelor și revine în mediu. Dar, o parte din apa existentă sub formă de vapori, în atmosfera din recipientele de cultură, difuzează în exteriorul vaselor, la nivelul bușoanelor sau a foliilor care obturează flacoanele, se ajunge, în timp, la o deshidratare și concentrare gradată a substanțelor din mediile de cultură; astfel, după săptămâni sau luni de cultură, fără operarea de subculturi, substratul gelificat suferă fisurări. În consecință, în urma unui astfel de proces, în timp, se produce o dezechilibrare puternică a raportului hidric și ionic din mediile de cultură, ceea ce face ca, treptat, vitroculturile să intre – din punct de vedere fiziologic – în procese de carență, sau de excedent ionic ori osmotic, fapt care determină celulele, țesuturile sau vitroplantulele să devină senescente, și lent acestea să se necrozeze; dacă, în astfel de cazuri nu se operează – în timp util – subcultivarea acestora, inoculii pot muri. Pentru a se preîntâmpina o astfel de situație, periodic se impune transferarea vitroculturilor pe medii proaspete, cu sau fără repicare.

Întrucât apa de robinet conține diferiți compuși *anorganici* (ioni grei și săruri) sau *organici* (cloroderivate, detergenți și alte variate rezidii), precum și germeni, spori, ori particule aflate în suspensie, aceasta este improprie pentru a fi utilizată în prepararea mediilor de cultură. Ca atare, pentru prepararea mediilor de cultură, optime dezvoltării normale a vitroculturilor, se recomandă utilizarea apei bidistilate sau a apei distilate, preparată în distilatoare din sticlă.

Apa pură poate fi obținută și prin alte metode. Astfel, una din metode se bazează pe sisteme osmotice, apa – prin presare – fiind forțată să treacă printr-o membrană purificatoare, de tip special. Debitul unei astfel de instalații poate fi de circa 40 l/h. O altă metodă de purificare a apei constă în trecerea acesteia prin coloane de rășini schimbătoare de ioni (o coloană anodică și alta catodică), caz în care apa rezultată este deionizată, "eliberată" fiind de anionii și cationii pe care îi deținea. Dar, această apă poate să prezinte dezavantajul remanenței în ea a nenumărați germeni, unii dintre ei fiind producători de toxine; acești germeni, postautoclavare, prin resturile lor organice pot să exercite efecte nefavorabile asupra evoluției vitrocultu-

rilor. Există şi metode sofisticate de preparare a unei ape ultrapure, de exemplu prin sintetizarea acesteia din oxigen şi hidrogen (vezi *Biondi* şi *Thorpe*, 1981), apă care însă nu este utilizată în vitroculturile vegetale, fiind considerată ca o apă moartă, nebiologică.

Apa distilată poate fi păstrată un timp, fără să-şi modifice calităţile, în vase închise, fie din sticlă, fie din material plastic, mai rar din inox.

3.4.1.1.2. *Sărurile anorganice*

În mediile de cultură destinate vitroculturilor vegetale, o componentă de bază o reprezintă sărurile sau *substanţele anorganice*. Sărurile minerale cele mai frecvent utilizate în prepararea mediilor de cultură, potrivite pentru creşterea *in vitro* a cormofitoinoculilor, sunt *fosfaţii*, *azotaţii*, *clorurile* şi *sulfaţii* de: Ca, K, Mg, Mn, Al, Fe, Mo, Zn, Cu, Na etc. (vezi tabelele 5-9). Cormofitoinoculii, pe parcursul dezvoltării lor *in vitro*, vor valorifica selectiv diferitele elemente chimice, sub formă de ioni. Din punctul de vedere al nutriţiei minerale a plantelor, elementele chimice recomandate ca fiind necesare vitroculturilor vegetale (deci cele care trebuie să fie prezente în mediile de cultură), în mod arbitrar, pot fi subîmpărţite astfel:

- *macroelemente*: C, O, H, N, P, S, K, Ca, Mg, elemente care sunt adăugate în mediile de cultură în cantităţi de milimoli (mM) (N anorganic circa 25 – 40 mM; K circa 20 mM, sau mai mult; P, Mg, Ca şi S în doze de 1 – 3 mM, respectiv circa 300 – 400 mg/l);

- *microelemente* (sau *oligoelemente*): Fe, Mn, Zn, Al, B, Cu, Mo, Na, Co, şi I, introduse în mediile de cultură în concentraţii de micromoli (μM), respectiv circa 0,5 – 0,01 mg/l. Întrucât Cl-ul este bine tolerat de explante, cationii – în numeroase reţete – sunt administraţi sub formă de cloruri, săruri care sunt mai uşor solubile.

C, O şi H reprezintă circa 95% dintre compuşii chimici care se găsesc în materialul vegetal, uscat; aceste elemente, împreună cu N, formează constituienţi de bază care compun materia vie.

Rolul fiziologic al fiecărui element aflat în mediul de cultură variază în funcţie de forma chimică sub care el se găseşte în mediu, *concentraţia* acestuia, *natura* explantelor şi specificul culturii, dacă cultura este de tip *primar* sau este o *subcultură*, ş.a.m.d. În general, în momentul iniţierii unui experiment fie preluăm o reţetă de mediu ale cărei efecte sunt cunoscute ca fiind corespunzătoare scopului pe care ni l-am propus, fie tatonăm, prin experimente preliminare făcute de noi înşine, reacţia ţesuturilor luate în studiu, la principalele medii de cultură devenite clasice, respectiv *Murashige-Skoog* (1962)(MS), *Gamborg* şi colaboratorii (1968)(B5) şi

altele. Prin omiterea din compoziţia mediului de cultură a N, S sau a P, la explante constând din fragmente de liber secundar, prelevate din rădăcini metamorfozate de morcov, moartea inoculilor – de acest tip – survine după cca. 2 luni de la iniţierea culturilor. Experimental s-a dovedit că omiterea N-ului din mediile de cultură, respectiv carenţa în N, la unele culturi de calus, conduce la acumularea de antociani în vacuolele celulelor, inoculilor; dacă situaţia persistă, în celule se produc perturbaţii ale metabolismului glucidic şi proteic, în final celulele necrozându-se. La explantele de morcov şi de viţă-de-vie sălbatică, lipsa de sulf din mediile de cultură cauzează o clorozare a vitroculturilor. În schimb, excesul de S şi de P determină apariţia de necroze şi provoacă moartea ţesuturilor, după aproximativ 2–3 subculturi.

Gautheret (1937) a făcut numeroase studii în care a dovedit importanţei azotaţilor, fosfaţilor, sulfaţilor şi a clorurilor (de K, Ca, Mg, şi Na) în evoluţia favorabilă *in vitro* a explantelor de morcov. *Hildebrandt* şi colaboratorii (1940) au efectuat cercetări sistematice, pe ţesut tumoral de tutun, şi au constatat că în absenţa Fe şi a anionului PO_4^{3-} din mediile de cultură se înregistrează o slabă dezvoltare a ţesuturilor inoculate; totodată, aportul insuficient de KNO_3 şi de $Ca(NO_3)_2$ conduce la o involuţie a dezvoltării inoculilor de natură tumorală, în timp ce prezenţa NaH_2PO_4, a citratului de fier, a $Ca(NO_3)$, KCl şi a B s-a dovedit a fi indispensabilă în creşterea corespunzătoare a vitroculturilor.

Heller, renumit nutriţionist vegetal, între anii 1947 – 1953, şi-a adus o contribuţie importantă în studierea rolului jucat de diferite săruri minerale asupra bunei evoluţii *in vitro* a variatelor tipuri de explante provenite de la diverse specii de plante. El a constatat că, dintre cationi, lipsa de K a cauzat o încetinire a creşterii vitroculturilor, în schimb, o mărire a concentraţiei de K a condus la o sporire a creşterii explantelor de tutun şi de viţă-de-vie sălbatică; *Heller* a observat însă că, ţesuturile cultivate pe medii aseptice necesită o concentraţie redusă de ioni de Ca (Ca şi K jucând un rol important în reglarea permeabilităţii la nivelul membranelor celulare, precum şi în fluidificarea sau în mărirea vâscozităţii protoplasmei, efectele lor fiind de cele mai multe ori antagonice; alături de anioni, aceşti cationi intervin în efectuarea schimburilor ionice, la nivelul biomembranelor). În general, pentru asigurarea unei optime evoluţii a ţesuturilor meristematice, în natură sau *in vitro*, este necesar mult K, în timp ce ţesuturile senescente, ori cele care prezintă o dezvoltare lentă, manifestă o creştere ameliorată pe medii îmbogăţite în Ca, element care este considerat că deţine un *rol antitoxic*; carenţa de Ca şi de Mg cauzează tulburări grave culturilor de ţesuturi

vegetale, lipsa acestor cationi conducând la moartea celulelor; excesul de K, de Ca şi de Mg sunt suportate bine, în limite largi, de către cormofitoinoculi.

Celulele sunt sensibile la prezența în substratul de cultură a anionilor PO_4^{3-} şi SO_4^{2-}, a căror dozare trebuie respectată cu strictețe. Excedentul de fosfat sau de sulfat, în mediul de cultură, periclitează creşterea vitroculturilor, provocând moartea acestora. După *Heller* (1975), azotul anorganic este oportun să fie administrat sub formă de nitrați, întrucât s-a constatat că numeroase țesuturi vegetale, cultivate pe medii aseptice, nu pot utiliza azotul din ionul de amoniu. Adeseori însă, lipsa din mediile de cultură a anumitor combinații anorganice poate conduce la modificarea radicală a organogenezei, la nivelul variatelor tipuri de cormofitoinoculi. Astfel, în absența NH_4NO_3 din mediul de cultură, inoculii constând din cotiledoane de *Lactuca sativa* generează numai calus şi nu diferențiază muguraşi; dar, perturbații în manifestarea proceselor de organogeneză apar şi dacă pe lângă acest compus, din mediile de cultură lipsesc Fe-ul şi KH_2PO_4. În schimb, *Halperin* şi *Wetherell* (1967), experimentând pe țesut de morcov, au ajuns la concluzia că numai N redus, administrat sub formă de NH_4^+, induce formarea de embrioni somatici, în timp ce N-ul administrat ca NO_3^- este ineficient, din acest punct de vedere; cu toate acestea, există şi referiri bibliografice (după *Reinert* şi colab., 1966) privind experimente efectuate cu un acelaşi tip de test, care atestă obținerea de embrioni somatici – la două varietăți de morcov – pe medii conținând N numai sub formă de NO_3^-.

Uneori, absorbția selectivă a ionilor din medii poate provoca schimbări ale raporturilor ionice din substrat, ale pH-ului, modificându-se chiar solubilitatea unor săruri, determinând inaccesibilitatea unor ioni din mediu, în celulele vitroculturilor, sau precipitarea unor compuşi, mai ales în cazul mediilor lichide.

Nu numai studierea acțiunii macroelementelor i-a preocupat pe nutriționiştii şi pe vitrocultorii vegetali, ci îndelung studiate au fost şi efectele morfofiziologice şi biochimice ale *microelementelor*. Astfel, *Heller, Street, Steward, Gautheret*, şi alții, şi-au adus o contribuție importantă la cunoaşterea rolului fitofiziologic al elementelor: Fe, Zn, Mn, B, Mo, Cu şi I asupra creşterii țesuturilor şi celulelor cultivate *in vitro*. Actualmente, structura şi modul de reacție al multor enzime şi complexe enzimatice (a relațiilor de tip substrat – metal – enzimă) se explică prin punctele de interferență ale moleculelor lor cu microelementele, acestea dovedind că exercită efecte metabolice şi fiziologice diferite de cele îndeplinite de către macroelemente.

Tabelul 6. Concentrații ale compușilor frecvent întâlniți în rețetele de medii de cultură recomandate pentru cultivarea *in vitro* a țesuturilor și celulelor vegetale (în mM/l) (după *De Fossard* și colab., 1974)

Constituenți	Concentrația (în mM/l)		
	Scăzută	Medie	Ridicată
SĂRURI MINERALE			
NH_4NO_3	5,0	10,0	20,0
KNO_3	-	10,0	20,0
KH_2PO_4	0,1	-	-
NaH_2PO_4	-	1,0	2,0
KCl	1,9	-	-
$CaCl_2$	1,0	2,0	3,0
$MgSO_4$	0,5	1,5	3,0
H_3BO_3	0,01	0,05	0,15
$MnSO_4$	0,01	0,05	0,1
$ZnSO_4$	0,001	0,02	0,04
$CuSO_4$	0,00001	0,0001	0,0015
Na_2MoO_4	0,00001	0,0001	0,001
$CoCl_2$	0,0001	0,0005	0,001
KI	0,0005	0,0025	0,005
$FeSO_4$	0,01	0,05	0,1
Na_2EDTA	0,01	0,05	0,1
SUBSTANȚE ORGANICE			
AUXINE	0,0001	0,001	0,01
CITOCHININE	0,0001	0,001	0,01
M-inozitol	0,1	0,3	0,6
Acid nicotinic	0,004	0,02	0,04
Piridoxină HCl	0,0006	0,003	0,006
Tiamină HCl	0,0001	0,002	0,04
Biotină	0,00004	0,0002	0,001
Acid folic	0,0005	0,001	0,002
Pantotenat de calciu	0,0002	0,001	0,005
Riboflavină	0,0001	0,001	0,01
Acid ascorbic	0,0001	0,001	0,01
L-Cisteină HCl	0,01	0,06	0,12
Glicină	0,0005	0,005	0,05
Zaharoză	6,0	60	120

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 7. Compoziția *ionică*, comparativă, a principalelor medii de cultură utilizate în vitroculturile vegetale (exprimată în în mE/l) (după *Augé* și colab. 1982)

Ioni	Tipuri de medii					
	Murashige-Skoog	Gamborg B5	Gautheret	Heller	Knop	White
NO_3^-	39,4	25,0	5,49	7,05	10,93	3,34
$H_2PO_4^-$	1,3	1,1	0,92	1,04	1,84	0,12
SO_4^{2-}	3,0	4,0	1,00	2,04	2,04	8,64
Cl^-	6,0	2,0	-	11,02	-	0,88
Total anioni (mE/l)	49,7	32,1	7,41	21,15	14,81	12,98
K^+	20,1	25,0	2,17	10,0	4,29	1,68
NH_4^+	20,6	2,0	-	-	-	-
Na^+	-	1,1	-	8,09	-	2,92
Ca^{++}	6,0	2,0	4,24	1,02	8,48	2,54
Mg^{++}	3,0	2,0	1,00	2,04	2,04	5,84
Total cationi (mE/l)	49,7	32,1	7,41	21,15	14,81	12,98
Total ioni (mM)	93,3	60,2	9,58	39,8	23,34	17,45

mE/l = miliechivalent/l

Tabelul 8. Caracteristica principală, ionică, a câtorva soluții nutritive mai frecvent utilizate în vitroculturile vegetale (după *Augé* și colab. 1982)

Tipuri de medii	Concentrația ionică totală (mM)	Ionii dominanți	Forma de azot prezentă în mediu
Gamborg și colab. (B5)	60,2	NO_3^-, K^+	NO_3^- / NH_4^+ = 12,5
Murashige – Skoog	93,3	NO_3^-, NH_4^+, K^+	NO_3^- / NH_4^+ = 1,91
Gautheret	9,6	NO_3^-, Ca^{++}, K^+	NO_3^-
Heller	39,8	K^+, Na^+, Cl^-	NO_3^-
Knop	23,3	NO_3^-, Ca^{++}	NO_3^-
White	17,5	SO_4^{--}, Mg^{++}, NO_3^-	NO_3^-

De exemplu, Fe-ul este implicat în activitatea peroxidazică și în cea citocromoxidazică, el intervenind și în metabolismul intranuclear, în sinteza ARN-ului (nuclear și citoplasmatic) și în sinteza proteică. Fierul, fiind legat chimic în forme greu asimilabile de către celula vegetală, trebuie administrat sub formă chelatizată, ca Na_2Fe EDTA (sarea de natriu a acidului etilendiaminotetraacetic) sau ca FeDTPA (Sequestren 330), FeEGTA, FeEDDHA (Sequestren 138) etc. În soluția finală, potrivit indicațiilor lui *Murashige* și *Skoog* (1962), trebuie să existe 27,8 mg/l sulfat feros și 37,3 mg/l

Na_2EDTA. Un alt microelement, Zn-ul este implicat în sinteza auxinei, în lipsa lui se perturbă formarea triptofanului, precursor al auxinei native; Mn-ul participă în proteosinteză și represează formarea ARN-ului în celulele rădăcinilor de mazăre; B-ul joacă un rol important în desfășurarea normală a proceselor de diviziune și de creștere; Mo-ul este implicat în activitatea sistemului nitratreductazic, iar Al-ul este catalizator al multor reacții biochimice etc.

Heller (1953) a dovedit faptul că omiterea totală a microelemenelor din mediile de cultură conduce la micșorarea cu 40% a creșterii celulelor, respectiv a vitroculturilor, începând cu primul pasaj, ceea ce cauzează – pe mediile carențate – la sfârșitul celui de al treilea pasaj, moartea cormofito-inoculilor. Amestecul de microelemente cel mai frecvent utilizate în mediile pentru cultivarea *in vitro* a țesuturilor și celulelor vegetale a fost conceput de către *Heller*. Dar, *Boxus* și *Quoirin* (1974) au observat că la o cultură de apexuri de *prun* este oportună adăugarea microelementelor după rețeta lui Heller, dar de 100 de ori mai concentrată, întrucât numai în acest mod s-a realizat o creștere normală a meristemelor.

După cum s-a putut constata, există variate puncte de vedere cu privire la rolul și importanța diferitelor elemente chimice în buna evoluție a vitroculturilor, concluziile fiecărui autor fiind desprinse din experimentele proprii. Cu toate acestea, multe puncte de vedere ale diferiților autori nu sunt, întotdeauna, divergente. Astfel, s-au putut stabili rețete de medii de cultură, actualmente considerate clasice, preferate de către marea majoritate a cercetătorilor, atât pentru calitatea acestora, cât și pentru ca să se asigure o mai mare uniformizare a punctului de plecare în organizarea diferitelor experimente. În consecință, cele mai utilizate săruri, ca surse de macro- și microelemente, în vitroculturile vegetale sunt: KNO_3, KCl, NaH_2PO_4, $Ca(NO_3)_2$ și $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, KI și H_3BO_3; Fe-ul, cu toate că este prezent în unele rețete de microelemente sub formă de $FeCl_3$, acesta trebuie adăugat și sub formă chelatizată, de FeEDTA (vezi tabelele 5 și 6).

După recomandările lui *Gautheret* (1959), soluția *Knop* (1865) (formată din numai patru săruri minerale) corespunde creșterii cu succes *in vitro* a multor tipuri de vitroculturi, mai ales atunci când aceasta este diluată la jumătate. Soluția de macroelemente imaginată de către *White* (1943) este potrivită mai ales pentru creșterea *in vitro* a țesuturilor tumorale, ea ne fiind recomandată cultivării *in vitro* și a altor tipuri de explante. În schimb, mediul nutritiv *Heller* (1953) (macro- și microelemente) corespunde unei optime proliferări a celulelor de proveniență variată; dar, mediul cu macroelemente – imaginat de *Heller* – s-a constatat că poate cauza necroze,

explantelor de tutun. Pentru creşterea explantelor de orhidee, sau a celor de ferigi, este recomandabilă utilizarea mediului *Knudson* (1925). Mediul *Murashige-Skoog* (1962) (MS), conceput pentru asigurarea creşterii calusului de tutun, comparativ cu mediile *Knop* (1865) şi *White* (1943) este superior, ca şi eficienţă, în susţinerea dezvoltării vitroculturilor vegetale (vezi *Margara*, 1982); mediul MS, ce deţine un foarte ridicat conţinut în N (60 miliechivalenţi la litru), dintre care o treime se află sub formă redusă, de NH_4^+ şi de K^+, face ca acesta să fie favorabil susţinerii proceselor de organogeneză, cu precădere formării de muguraşi. Uneori, mai ales la germinarea în condiţii aseptice a seminţelor, se practică diluarea la jumătate a mediului MS, raportul de NH_4^+ - din cadrul N-ului total din mediu – rămânând acelaşi, chiar dacă mediul a fost diluat. Cu toate că în mediul MS concentraţia de K este destul de mare, pentru activarea într-o şi mai mare măsură a diviziunilor celulare, se impune o creştere a concentraţiei de K. Un astfel în mediu a fost imaginat de *Gamborg* şi colaboratorii (1968) (B5). Mediul *Nitsch* şi *Nitsch* (1956) are un aport de K de patru ori mai mare decât concentraţia de K din mediul *Heller*.

În tabelul 9 se poate analiza conţinutul total în diferite elemente chimice, în principalele medii de cultură utilizate în creşterea *in vitro* a variate tipuri de cormofitoinoculi.

Nu trebuie scăpat din vedere faptul că, agar-agarul este un produs natural extras din algele marine, iar prezenţa lui în mediile de cultură le aduce acestora un aport suplimentar de elemente chimice (în urme), preponderent Ca şi Mn (vezi tabelul 10).

Uneori, după autoclavare, în mediile de cultură lichide se poate constata apariţia unei turbidităţi a soluţiei finale, fenomen provocat – în primul rând – de modificarea valorii iniţiale a pH-ului (după *Vyskot* şi *Bezdék*, 1984). Ca urmare a acestui fapt, în vitroculturile respective se remarcă o deteriorare a creşterii celulare. Precipitarea unor medii de cultură, după autoclavare, este accelerată şi de temperaturile înalte atinse în cursul sterilizării acestora. Mediul *Murashige-Skoog* (1962) standard, la pH mai ridicat de 5, după autoclavare, prezintă o tendinţă de turbiditate şi formarea unui precipitat, pe măsura scăderii pH-ului cu 0,2-0,5 unităţi. Analiza chimică a acestui precipitat amorf a demonstrat că el este alcătuit dintr-un amestec de fosfat feric şi fosfat feros. Cercetările au arătat că, în soluţia stoc de Fe (preparată prin chelatizarea sulfatului feros cu o cantitate echimoleculară de Na_2 EDTA), mai mult de 10 % din ionii bivalenţi de Fe – din totalul ionilor introduşi în soluţie – pot fi găsiţi ca fiind liberi, nechelatizaţi. Ionii liberi de Fe bivalent, la pH în jurul valorii de 5, sunt oxidaţi în Fe

trivalent, ion ce precipită în soluție sub formă de fosfat feric. În decursul creșterii vitroculturilor, ca o consecință a proceselor fiziologice de absorbție

Tabelul 9. Conținutul total în elemente chimice prezente în cele mai utilizate rețete de medii de cultură (după *Bhojwani* și *Razdan*, 1983, modificat)

Elemente și ioni	Concentrația	Medii					
		White (1963)	Heller (1953)	MS	ER	B5	N
NO_3^-	Mmol l^{-1}	3,33	7,05	39,41	33,79	25,00	18,40
NH_4^+		-	-	20,62	15,00	2,00	9,00
N		3,33	7,05	60,30	48,79	27,03	27,40
P		0,138	0,90	1,25	2,50	1,08	0,50
K		1,66	10,05	20,05	21,29	25,00	9,90
Ca^{++}		1,27	0,51	2,99	2,99	1,02	1,49
Mg^{++}		3,04	1,01	1,50	1,50	1,00	0,75
Cl^-		0,87	11,08	5,98	5,98	2,04	2,99
Fe	µmol l^{-1}	12,50	3,70	100,00	100,00	50,10	100,00
S		4502,0	1013,5	1730,0	1610,0	2079,9	996,80
Na^+		2958,0	7966,0	202,00	237,20	1089,0	202,00
B		24,20	16,00	100,00	10,00	48,50	161,80
Mn^{++}		22,40	0,40	100,00	10,00	59,20	112,00
Zn^{++}		10,40	3,40	30,00	37,30	7,00	34,70
Cu^{++}		0,04	0,10	0,10	0,01	0,10	0,10
Mo		0,007	-	1,00	0,1	1,00	1,00
Co		-	-	0,10	0,01	0,10	-
I		4,50	0,06	5,00	-	4,50	-
Al^{++}		-	0,20	-	-	-	-
Ni		-	0,10	-	-	-	-

MS = Murashige-Skoog (1962)
ER = Eriksson (1965)
B5 = Gamborg și colab. (1968)
N = Nitsch (1969)

Tabelul 10. Compoziția chimică a agarului Difco (după *Pierik*, 1971)

Constituenți	Bacto-agar	Noble-agar	Purified-agar
Cenușă	4,5 %	2,6 %	1,75 %
Calciu Ca	0,13 %	0,23 %	0,27 %
Ba	0,01 %	0,01 %	0,01 %
Si	0,19 %	0,26 %	0,09 %
Cl	0,43 %	0,18 %	0,13 %
S	2,54 %	1,90 %	1,32 %
N	0,17 %	0,10 %	0,14 %
Fe	11,00 mg l^{-1}	11,00 mg l^{-1}	11,00 mg l^{-1}
Mg	285,00 mg l^{-1}	260,00 mg l^{-1}	695,00 mg l^{-1}
Cu	5,00 mg l^{-1}	7,50 mg l^{-1}	20,00 mg l^{-1}

selectivă a ionilor și a schimburilor ionice realizate între celule și țesuturi, cu mediul de cultură, pH-ul scade sub 5, fapt care declanșează fenomene de

turbiditate şi chiar sedimentarea unor săruri din mediile de cultură lichide. Aceste aspecte negative pot fi prevenite printr-o stabilizare adecvată a Fe-ului bivalent, crescând nivelul de Na_2EDTA în mediul de cultură. Un excedent de Na_2EDTA, la un raport molar de Fe^{++} / Na_2EDTA de 1:2, face ca chelatizarea ionilor bivalenţi de Fe să fie completă, concentraţia ionilor de fier scăzând în mediu sub 0,1%. În consecinţă, *Vyskot* şi *Bezdék* au recomandat prepararea soluţiei de FeEDTA prin utilizarea următoarelor cantităţi din compuşii implicaţi în amestecul final de fier chelatizat: 100 μM $FeSO_4 . 7 H_2O$, în amestec cu 200 μM$Na_2EDTA . 2 H_2O$. Excedentul de complexoni poate să servească la o stabilizare a celorlalţi cationi prezenţi în mediul de cultură, ceea ce previne producerea unor reacţii de substituire. Mediile care au o stabilitate ionică de acest tip rămân limpezi, pH-ul păstrându-se la valorile iniţiale, timp de mai multe săptămâni; în plus, sterilizarea la cald a mediilor de cultură nu mai provoacă precipitarea sărurilor sau schimbarea valorii pH-ului. În acest mod, precipitarea sărurilor în mediile de cultură lichide este evitată, chiar şi la oscilaţii mai mari ale pH-ului, cuprinse între 4,8 şi 6,0.

Problema precipitării Fe-ului în mediul *Murashige-Skoog* a fost ridicată în anul 1983, de către *Dalton* şi colaboratorii. Pentru preîntâmpinarea apariţiei acestui fenomen, autorii citaţi au procedat la o scădere a conţinutului în Fe, modificând concentraţia acestuia în raport cu Na_2EDTA, ceea ce a condus la schimbarea raportului dintre compuşii în cauză la 1/3, păstrându-se astfel constantă concentraţia de Na_2EDTA, recomandată în literatura de specialitate.

Întrucât capacitatea de tamponare a pH-ului, la mediul de cultură lichid *Murashige-Skoog* este scăzută (acest mediu conţinând o cantitate minimă de substanţe tampon), *Vyskot* şi *Bezdék* (1984) au recomandat adăugarea de citrat de Na, în mediul MS, în concentraţie de 1,25 mM şi de tampon fosfat – citrat (tampon *Mcilvaine*, diluat de 10 x). Acest fapt face ca, la sfârşitul intervalului de cultivare a suspensiilor celulare, de exemplu a celor de tutun, valorile pH-ului să rămână neschimbate, ele oscilând doar cu ± 0,15.

3.4.1.2. Compuşii *organici*

White a dovedit, încă în anul 1934, că prin utilizarea *zaharozei* şi a *extractului* neautolizat de *drojdie*, în prepararea mediilor de cultură optime cultivării *in vitro* a explantelor vegetale, se poate obţine un complex nutriţional de calitate superioară. După descoperirea (în anul 1937) compoziţiei

chimice a extractului de drojdie, s-a constatat că, de fapt, acesta conține *aminoacizi* (îndeosebi *glicină*) și *vitamine* (în special *tiamină*). Ulterior, *Robbins* și *Schmidt* (1938 – 1939) au preparat medii de cultură cu adaos de *piridoxină* și de *acid nicotinic*. Treptat, s-a descoperit și utilitatea altor substanțe organice, cum ar fi a *biotinei*, a *acidului pantotenic*, a *colinei*, a *inozitolului* sau a unor extracte naturale, cum sunt cele din *cazeină*, iar din fructe, a *laptelui din nuca de cocos*, și altele.

Gautheret, după anul 1934 (data descoperirii proprietăților auxinei), a fost primul care a introdus acidul beta-indolilacetic (AIA) în mediile de cultură destinate creșterii *in vitro* a explantelor prelevate de la specii de cormofite și a descris efectul rizogen al acestui compus, recunoscut ulterior ca fiind un fitohormon. Mult mai târziu, în rețetele de medii de cultură au fost adăugați și alți fitohormoni, cum sunt: citochininele, giberelinele, etilena, acidul abscisic și numeroși regulatori de creștere, de sinteză.

3.4.1.2.1. *Surse de carbon organic*

Explantele inoculate pe medii aseptice, chiar dacă celulele lor conțin clorofilă, sunt tributare mediului de cultură în ceea ce privește carbonul organic, cu precădere compușilor cu valoare energetică ridicată, cum sunt *glucidele*.

Atât timp cât țesuturile și celulele cormofitelor sunt crescute în condiții artificiale, pe medii cu adaos de carbon *glucidic*, acestea prezintă un metabolism de tip *heterotrof* sau *mixotrof*. Dar, în momentul transferării *ex vitro* a plantulelor, respectiv a trecerii acestora în mediul septic, în cadrul natural de viață, plantate fiind pe un substrat anorganic, acestea redevin *fotoautotrofe*.

Există mai multe posibilități de susținere energetică a vitroculturilor, prin introducerea în mediile lor de cultură a unor *glucide*, întrucât numai acestea pot fi utilizate, cu eficiență energetică maximă, ca substrat respirator, de către celulele plantelor superioare cultivate *in vitro*. Prin degradarea glucidelor, celulele *in situ* sau *in vitro* își pot obține *energia* necesară îndeplinirii proceselor lor vitale, la cote normale, respectiv pentru realizarea multiplicării, creșterii, și diferențierii celulare. În vitroculturile vegetale, deși vitroplantulele sau unele calusuri sunt verzi, procesul de fotosinteză în celulele cormofitoinoculilor este slab; de regulă, cloroplastele lor sunt blocate cu amidonul sintetizat pe baza resurselor glucidice prezente în mediul de cultură. Pe de altă parte, glucoza – prin polimerizare – dă naștere la celuloză, compus de bază în formarea peretelui celular, pectocelulozic, al

plantelor. Cu toate că diferitele tipuri de glucide (trioze, pentoze, hexoze şi heptoze) îndeplinesc funcţii metabolice importante, în mediile de cultură destinate creşterii *in vitro* a majorităţii explantelor vegetale, optimă, respectiv eficientă ca resursă energetică s-a dovedit a fi *zaharoza*; într-o măsură mai mică, efecte similare exercită *glucoza* şi *fructoza*. În anumite experimente, au fost utilizate *maltoza* şi *rafinoza*, iar în stare coloidală, *amidonul* (polizaharid).

În general, cercetările au dovedit că vitroculturile vegetale evoluează cel mai bine în prezenţa în mediile de cultură a zaharozei, în concentraţie de 2-3%; un număr restrâns de culturi manifestă o creştere bună (de exemplu meristemele unor specii lemnoase), pe medii cu 3% *glucoză*. Concentraţiile optime de zaharoză sau de glucoză oscilează între 1,2 - 8%, în dependenţă de *natura* explantului, de tipul de cultură, de *specie* şi de *scopul* urmărit. *Gautheret* (1959) a dovedit că proliferarea celulelor explantelor de morcov, la lumină, începe de la o concentraţie de 0,1% zaharoză în mediul de cultură; ridicând aportul de zaharoză la 2%, el a obţinut o dezvoltare optimă a ţesuturilor; mărind concentraţia de zaharoză la 3% s-a remarcat o proliferare maximă a celulelor aflate în cultură; peste concentraţia de 3% zaharoză, creşterea celulelor şi a ţesuturilor a fost inhibată, fără însă ca zaharoza să devină toxică. Dacă se depăşeşte concentraţia de zaharoză peste pragul de toleranţă (variabil în funcţie de *natura* ţesuturilor inoculate şi de *tipul* de cultură), celulele treptat se plasmolizează, din cauza presiunii osmotice crescute a mediului de cultură. Până la intervenţia acestui moment critic, ridicarea concentraţiei de glucide solubile în mediile de cultură conduce la acumularea de amidon, în cloroplaste. În condiţii normale, acumulările de amidon se constituie în valoroase rezerve nutritive, pentru celulele vitroculturilor care trec prin procese de morfogeneză. Mediile cu 8% zaharoză stimulează tuberogeneza la vitroculturile de lăstari de cartof.

Alcoolii sunt utilizaţi în mediile de cultură a cormofitoinoculilor, nu ca sursă de carbon organic energetic, ci cu alt rol. Există experienţe prin care s-a dovedit însă, că *glicerolul* poate fi folosit şi ca sursă energetică, în unele vitroculturi vegetale (după *Gautheret*, 1959); în schimb, monoalcoolii: *metanol*, *etanol*, *propanol*, *butanol* etc. nu pot fi utilizaţi în acest scop; *eritrolul* sau *glicerolul*, în concentraţii scăzute (de 0,5%), adăugaţi mediului cu glucide, uneori, potenţează efectul acestorea. Alţi alcooli, cum sunt: *propanolul*, *butanolul* şi *phloridzinul*, chiar şi în diluţii mari, în vitroculturile vegetale s-au dovedit a fi toxici. *Glicerolul*, *manitolul* şi *sorbitolul*, sunt utilizaţi, adeseori, fie ca regulatori osmotici, în tehnicile care operează

cu protoplaşti, fie ca şi agenți crioprotectori, în vederea scoaterii apei din celule, prin exosmoză, prealabil crioconservării cormofitoinoculilor.

Acizii organici au o valoare energetică minoră; în prezența acizilor succinic, glutaric, fumaric, malonic, piruvic etc. creşterea țesuturilor vegetale a fost inhibată cu 85%, în raport cu evoluția culturilor înregistrată în prezența zaharozei.

Există totuşi țesuturi de natură tumorală – virală – la care prezența acizilor: fumaric, succinic şi citric (în concentrații de 10 mM), în mediile de cultură, exercită un rol favorabil asupra creşterii vitroculturilor. Piruvatul poate, de asemenea, să sporească creşterea celulară, la unele tipuri de explante vegetale.

3.4.1.2.2. *Surse de azot organic*

Țesuturile vegetale cultivate „in vitro", ca de altfel şi plantele superioare, sunt autotrofe față de azot, ele preluând acest element din substanțe anorganice, încorporându-l în biostructurile celulare. Cu toate acestea, s-a constatat că, adăugarea în mediile de cultură a unor surse de azot organic, *aminoacizi* sau *uree*, în anumite cazuri, conduce la optimizarea creşterii şi multiplicării celulelor vegetale.

Încă *White* (1939) a stabilit că, adaosul de *glicină* îmbunătățeşte creşterea rădăcinilor de tomate. *Ureea* şi unele *baze azotate* (*alantoina* şi *ornitina*) s-au dovedit a fi, uneori, eficiente ca surse de azot organic. *Asparagina, arginina, tirozina* şi *glutamina* exercită un efect favorabil, moderat, asupra creşterii unor vitroculturi. În general, izomerii *levogiri* sunt mai eficienți din punct de vedere fiziologic şi metabolic, decât cei dextrogiri. S-a constatat chiar că, există unele antagonisme între perechile de aminoacizi; astfel, în cazul *acidului aspartic* şi al *asparaginei*, formele dextrogire – în culturile de rădăcini de tomate – au anulat rolul activ exercitat de formele levogire, în schimb formele dextrogire ale *histidinei*, *leucinei*, *izoleucinei* şi cele ale *norleucinei* au fost mai puțin inhibitoare decât izomerii levogiri, acțiunea inhibitoare fiind mai puternică la pH neutru, în raport cu efectul înregistrat în mediile cu pH acid (după *Street*, 1974).

Dar, în general (după *Biondi* şi *Thorpe*, 1981), introducerea în mediul de cultură a unei surse de azot organic, uneori poate să fie chiar dăunătoare; de aceea, este bine ca efectele unor astfel de compuşi să fie tatonate cu anticipație. Aportul de aminoacizi este oportun atunci când urmărim formarea de calus, mai ales în cazul în care calusul respectiv va fi utilizat pentru inițierea unor suspensii celulare (*Gautheret*, 1959). Dozele în care se

recomandă administrarea aminoacizilor în mediile de cultură utilizate în vitroculturile vegetale variază de la un autor la altul; în mare, concentrațiile oscilează între: 2 mg/l la *glicină*, 100 mg/l la *asparagină* sau *tirozină* şi 10 mg/l la *levo-arginină* şi la *cisteină*.

3.4.1.2.3. *Vitaminele*

Investigațiile referitoare la influența exercitată de către diferitele vitamine asupra creşterii vitroculturilor îşi găsesc originile în cercetările efectuate încă în epoca de pionierat a culturilor de celule şi țesuturi vegetale, moment în care – studiindu-se reacția variatelor tipuri de explante, la medii de cultură de compoziții diferite – s-a analizat şi comportamentul acestora pe substraturi de cultură cu adaos de extracte de origine vegetală sau animală. Descoperirea efectelor favorabile ale vitaminelor asupra culturilor de țesuturi vegetale s-a petrecut întâmplător (după *White*, 1963). Cercetările întreprinse, între anii 1922-1940, de către diferiți experimentatori, au permis semnalarea existenței în extracte a unor substanțe bioactive, pe care *Kotte*, în anul 1922, le-a denumit *vitamine*. Apoi, an de an, cercetările referitoare la studierea influenței diferitelor vitamine asupra evoluției variatelor tipuri de vitroculturi au progresat foarte mult. În momentul de față, vitaminele sunt prezente în toate rețetele de medii de cultură, în concentrații variabile (în funcție de natura inoculilor), cel mai frecvent ele fiind utilizate în diluții de 1.10^{-5}, la 1.10^{-10}, fiind considerate ca indispensabile în asigurarea unei bune funcționalități a celulelor şi a unei evoluții favorabile a culturilor de cormofitoinoculi, cu toate că plantele verzi sunt autotrofe, în raport cu vitaminele. Reacția explantelor, mai ales în cultura primară, este marcată mult de încărcătura endogenă, cu vitamine, a celulelor şi a țesuturilor inoculate, de condițiile de cultură şi de compuşii din mediul de cultură, ansamblu care exercită o influență complexă asupra efectelor vitaminelor exogene, la un moment dat existând posibilitatea *cumulării* acțiunii mai multor substanțe, care prin asociere conduc la înregistrarea – prin convergență – a unor rezultate finale bune.

Vitamina B_1, sau *tiamina*, are o valoare biologică deosebită, motiv pentru care aceasta este frecvent recomandată ca adaos la mediile de cultură destinate cultivării *in vitro* a cormofitoinoculilor, ea stimulând creşterea celulelor şi cea a țesuturilor.

Vitamina B_6, sau *piridoxina*, la vitroculturile vegetale, este o vitamină nelipsită din rețetele de medii de cultură, fiind considerată ca un precursor al unor enzime.

Vitamina B_2, sau *riboflavina*, și *acidul pantotenic* (vitamina B_5), sunt în mică măsură recomandate în rețetele de medii destinate vitroculturilor vegetale, cu toate că *Morel* a utilizat, adeseori, cu bune rezultate, *pantotenatul de calciu*, mai ales în culturile de celule tumorale.

Vitamina B_{12}, sau *cobalamina*, este o vitamină mai rar folosită în vitroculturile vegetale. Cu toate acestea, *Reinert* și *White* (1956) (după *Gautheret*, 1959) au adăugat vitamina U_{12}, cu rezultate bune, în mediile de cultură destinate creșterii *in vitro* a țesuturilor tumorale.

Acidul nicotinic a fost utilizat, încă din anul 1938, în prepararea mediilor folosite în vitroculturile vegetale, fiind un component nelipsit din rețetele de medii de cultură considerate ca optime pentru creșterea *in vitro* a variați inoculi de natură cormofitică.

Biotina, sau vitamina H, a fost utilizată – pentru prima dată – de către *Morel* (1946), întrucât ea exercită un efect stimulator asupra proliferării celulelor vegetale aflate în vitrocultură.

Acidul folic se pare că are o acțiune stimulatoare, în special asupra creșterii țesuturilor tumorale, menținute la lumină; la întuneric, această vitamină poate deveni toxică, probabil în urma descompunerii sale în *acid p-aminobenzoic*, care este însă un cunoscut factor de creștere a microorganismelor (după *Gautheret*, 1959).

Vitamina C, sau *acidul ascorbic*, în concentrații de 1 – 50 mg/l, este recomandat ca factor *antioxidant*, prezența sa în mediile de cultură preîntâmpinând oxidarea fenolilor (compuși eliminați în medii de către unele explante, mai ales prelevate de la speciile lemnoase), fenolii oxidați exercitând o acțiune nocivă asupra inoculilor.

Un caz particular de compus bioactiv îl reprezintă *inozitolul*, considerat fie ca vitamină, fie ca glucid (denumiri similare: *myo-inozitol*, *mezo-inozitol* sau *m-inozitol*). Aproape toate rețetele de medii de cultură consideră m-inozitolul ca fiind un adaos obligatoriu la substratul de cultură *in vitro* a cormofitoinoculilor, recomandând utilizarea sa în concentrație de 100 mg/l, cu toate că nu se cunoaște încă – cu exactitate – rolul fiziologic al acestuia.

Vitaminele liposolubile E și D sunt utilizate într-o măsură mai mică în vitroculturile vegetale.

3.4.1.2.4. *Fitohormonii, regulatorii de creștere sau fitoregulatorii*

La plante, fitohormonii și fitoregulatorii sunt compuși organici, alții decât nutrienții, care în concentrații mici (de 1 mM) sau foarte mici (de 1 μM) stimulează, inhibă sau modifică – calitativ și cantitativ – *creșterea* și

dezvoltarea plantelor. Altfel spus, înmulțirea, creșterea și dezvoltarea plantelor, parcurgerea fază cu fază a tuturor etapelor ciclului biologic, constituie o înlănțuire de fenomene fiziologice aflate sub controlul unor stimuli *endogeni*, cu acțiune mai mult sau mai puțin specifică, numiți *fitohormoni*. Aceste procese pot fi influențate și prin tratamente administrate *exogen*, prin aplicarea unor compuși de sinteză, numiți fitoregulatori de creștere, care produc – la nivelul plantelor, organelor, țesuturilor sau a celulelor acestora – modificări de creștere, dar și de morfo- sau organogeneză, ori de embriogeneză. *Fitohormonii* controlează dezvoltarea ontogenetică a plantelor și în funcție de *natura* și *concentrația* acestora, efectele factorilor de mediu sau a celor endogeni se traduc pe plan celular, tisular, de organ, ori de plantă întreagă, într-un mod specific. *Fitoregulatorii*, sau regulatorii chimici, organici, care influențează creșterea și dezvoltarea plantelor superioare, sunt compuși de sinteză ce "mimează" efectele fitohormonilor, și datorită acestor calități, ei dețin o importanță practică deosebită, mai ales în fitotehnia modernă și în biotehnologia vegetală.

Fitohormonii ocupă poziții cheie în procesele de multiplicare și *creștere* celulară, în *morfogeneză*, respectiv în *diferențierea* și *dediferențierea* celulelor plantelor.

Biogeneza fitohormonilor este localizată, de regulă, în alte organe decât în organele țintă. Din locurile de sinteză, fitohormonii sunt translocați (sub formă activă sau inactivă) spre țesuturile și celulele apte să recepționeze mesajele acestora, să decodifice și să reacționeze la stimulii primiți, concentrațiile active fiind, adeseori, mai mici de 1 μM. Translocați la locul lor de reacție, fitohormonii determină producerea unor răspunsuri (schimbări) specifice, de natură biochimică, fiziologică și (sau) morfologică, respectiv celulară și structurală.

Sinteza fitohormonilor este localizată în diferite zone ale plantelor, în funcție de natura lor. După sinteză, aceștia pot fi păstrați un timp la locul lor de origine (sub formă activă sau inactivă), ori pot migra în diferite organe ale plantelor, acumulându-se în anumite celule și țesuturi, unde ei acționează imediat, sau sunt menținuți inactivi, până la apariția momentului propice ca aceștia să-și exercite influența ce-i caracterizează. Faptul că „semnalul" purtat de către fitohormoni marchează un răspuns imediat, sau întârziat, depinde de starea fiziologică a centrilor receptori (celule, țesuturi sau organe), de *stadiul* de dezvoltare al plantelor (organelor), de *natura* și *nivelul* semnalului primit sau interceptat, de *interacțiile* acestuia cu alți fitohormoni, de *condițiile* de mediu ș.a.m.d.

Celulele responsabile de *biogeneza* fitohormonilor, ca de altfel şi cele care *decodifică* semnalul lor, trebuie să deţină un sistem enzimatic adecvat sintezei sau deblocării căilor metabolice responsabile de asigurarea manifestării integrale a activităţii fiecărui compartiment biomolecular implicat în procesele de multiplicare şi de creştere celulară, în receptarea şi traducerea prin reacţii specifice a mesajelor conţinute în moleculele fitohormonilor, respectiv a regulatorilor de creştere. Fenomenele de multiplicare şi de creştere celulară sunt foarte complexe şi ele se complică într-o şi mai mare măsură în cazul explantelor vegetale cultivate *in vitro*, în regenerarea, dediferenţierea şi diferenţierea celulară, indiferent de gradul lor de organizare. Adeseori, în cazul vitroculturilor apar particularităţi de reacţie, ca urmare a interacţionării fitohormonilor endogeni – deţinuţi sau sintetizaţi în celule – cu fitoregulatori de creştere, administraţi exogen.

În prezent, se cunosc cinci categorii mari de fitohormoni: *auxine*, *citochinine*, *gibereline*, *acidul abscisic* şi *etilena*. Modul de acţiune al fitohormonilor, la nivel ultrastructural (de organit celular) şi molecular, nu este pe deplin elucidat. Căile metabolice de sinteză a acestora, de deblocare sau de blocare a activităţii fitohormonilor, ori de inactivare a lor prin descompunere enzimatică, sunt doar aproximate. Verificarea veridicităţii variatelor ipoteze de explicitare a modului de acţiune al acestora cade în sarcina cercetării fundamentale, a experimentelor efectuate în cadru natural sau în vitrocultură, cu diferite categorii de cormofitoinoculi, cultivaţi pe medii aseptice, în condiţii controlate, în prezenţa sau în absenţa a variaţi fitohormoni sau regulatori de creştere, administraţi singuri sau în amestec, în soluţii diluate ori concentrate. De soluţionarea multelor dileme existente în acest domeniu, va depinde nu numai depăşirea actualelor limite atinse în dirijarea dezvoltării inoculilor cultivaţi pe medii aseptice, dar şi extinderea aplicaţiilor practice ale fitohormonilor sau a regulatorilor de creştere, în fitotehnologia modernă. O mare importanţă o au studiile legate de conexiunile şi interdependenţele stabilite între diferitele ţesuturi şi celule, în raport cu fitohormonii administraţi, dar şi intuirea căilor prin care – din exteriorul celulelor şi al ţesuturilor vegetale – se poate interveni în anihilarea unor procese inhibitoare ale creşterii şi dezvoltării, în general, şi a vitroculturilor, în special, la inoculi cu structuri mai mult sau mai puţin complexe.

Existenţa fitohormonilor a fost intuită încă de *Darwin* (1880). Dar, rolul fiziologic al acestora şi modul lor de acţiune s-au putut dovedi abia un secol mai târziu, cercetările continuând şi în zilele noastre, cunoştinţele în domeniul fitohormonologiei vegetale progresând abia după izolarea, purificarea şi sintetizarea acestora, prin implicarea lor în tehnicile de vitrocultură

a celulelor şi ţesuturilor plantelor superioare. *Went*, în anul 1928, a pus în evidenţă prezenţa unei substanţe de creştere în coleoptilul de *Avena*, cu rol în curbarea fototropică a porţiunii apicale a acestuia. Ulterior, *Kőgl* şi *Haagen – Smit*, în anul 1931, au izolat – din urină umană – o substanţă activă, pe care au denumit-o „*auxina* A"*. Apoi, *Kőgl* şi colaboratorii, în anul 1934, au comunicat izolarea – tot din urină – a unei substanţe mai complexe, pe care aceştia au numit-o „heteroauxină" (respectiv „auxina A şi B"), compus care, ulterior, s-a dovedit a fi identic cu acidul 3 indolilacetic (sau altfel spus, acidul β indolilacetic) (AIA). Tot în anul 1934, *Kőgl* şi *Kostermans* au izolat AIA din celulele de drojdii, iar *Thimann*, în anul 1935, a extras AIA din celule de *Rizopus*. Interesant este faptul că, această substanţă a fost sintetizată încă din anul 1904, de către *Ellinger*, dar până în anii 1937 – 1939 nu i-au fost cunoscute proprietăţile biologice. După *Moore* (1989), la plantele superioare AIA este cea mai răspândită auxină, posibil unica auxină nativă. Ulterior, în anul 1977, *Thimann* a comunicat existenţa auxinei atât în corpul plantelor inferioare, cât şi în cel al plantelor superioare.

Între anii 1938 – 1939, prin experimente independente, întreprinse aproape simultan de către *Gautheret* şi *Nobécourt*, cu explante tisulare cultivate *in vitro*, s-a pus în evidenţă acţiunea fitohormonală, de excepţie, exercitată de auxină; în lipsa auxinei nu s-ar fi putut atinge multe din succesele biotehnologiei vegetale, moderne.

În laboratoarele lui *Skoog*, între anii 1955-1956, a fost izolată – din spermă de heringi – o altă substanţă bioactivă: *chinetina* (6-furfurilaminopurina). În laboratoarele lui *Steward*, în anul 1956, a fost descrisă acţiunea laptelui din nucă de cocos, asupra vitroculturilor vegetale. Prezenţa acestuia în mediul de cultură a indus formarea a numeroase vitroplantule. Ulterior, s-a dovedit că laptele din nuca de cocos este foarte bogat în *citochinine* native.

Giberelinele, *acidul abscisic* şi *etilena* au fost descoperite tot în perioada anilor '30. Efectele acestor fitohormoni, asupra vitroculturilor vegetale sunt de mai mică importanţă, în raport cu succesele obţinute cu compuşii respectivi, în practica agricolă.

Spre deosebire de fitohormoni, care sunt regulatori ai creşterii de natură endogenă, există o gamă largă de substanţe organice cu acţiuni fiziologice asemănătoare cu acelea ale fitohormonilor, dar care sunt regulatori de creştere *de sinteză*, ce aparţin – ca şi structură chimică – fie familiilor de

* în l.greacă *auxein* = creştere

substanțe fitohormonale native (având un nucleu identic sau apropiat de cel al fitohormonilor), fie au o altă structură chimică. Regulatorii de creștere, cu efecte asupra plantelor sau a vitroculturilor, au în comun faptul că ei exercită influențe asemănătoare fitohormonilor, stimulând, la diluții foarte mari, procesele de multiplicare celulară, de creștere și de diferențiere a celulelor, mimând modul de acțiune al acestora. Spre deosebire de fitohormoni, regulatorii de creștere (omologi ca și efecte fiziologice cu fitohormonii) sunt metabolizați mai lent decât hormonii endogeni, acțiunea fitoregulatorilor de sinteză fiind mai de durată și efectele mai puternice.

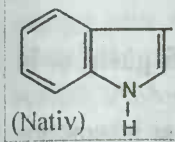
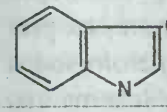
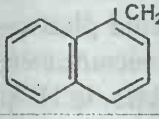
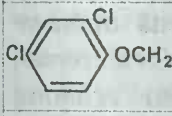
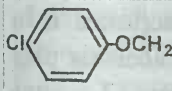
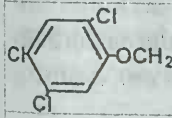
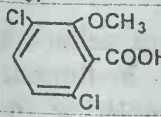
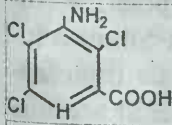
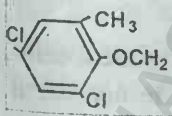
Unii autori nu fac o diferențiere netă între fitohormoni și fitoregulatori de creștere, grupând toate substanțele organice cu acțiune asupra creșterii într-o categorie generală, aceea a *hormonilor vegetali*.

În cele ce urmează, vom puncta câteva considerații generale cu privire la compușii care alcătuiesc familia auxinelor, a citochininelor, a giberelinelor, dar și a etilenei, a acidului abscisic și a altor regulatori de creștere de interes pentru vitroculturile vegetale, specificând și rolul lor fiziologic.

a. *Auxinele*

În plante, auxina se găsește fie *liberă*, ca acid 3-indoliacetic (AIA), fie *legată* sub diferite forme, cum ar fi: *glucobrasicina* (un tioglucozid prezent la crucifere), 3-indolilacetic-L-arabinoza (acidul 3-indolilacetic glicozidat cu L-arabinoza), ori 3-indolilacetic-D-glucoza (acidul 3-indolilacetic glicozidat cu D-glucoză) sau 3-indolilacetic-mezo-inozitolul (acidul 3-indolilacetic glicozidat cu mezo-inozitolul) etc., fie sub formă de combinații ale AIA cu acidul aspartic, glutamic sau cu acidul ascorbic.

Proprietățile auxinelor au fost relevate, din ce în ce mai mult, prin experimentele de vitrocultură, reușindu-se evidențierea importanței acestora prin analizarea reacției variatelor categorii de explante, la prezența auxinelor – singură sau în amestec cu alți compuși – în mediile lor de cultură. Prin procedee de sinteză chimică, s-a lărgit gama compușilor încadrați în această clasă de substanțe. În categoria auxinelor sunt grupate substanțe organice, de regulă acizi organici, care – la concentrații mai mici de 0,001 M – au capacitatea de a produce curbarea coleoptilului de *Avena*, stimulând *creșterea în lungime* a celulelor vegetale. Principalele auxine (vezi fig. 13) sunt: 1 – din categoria celor cu nucleu *indolic*: *acidul 3 indolilacetic* (AIA) (auxină nativă), *acidul indolilbutiric* (AIB) și *acidul indolilpropionic* (AIP); 2 – cu nucleu *naftalic*: *acidul 1 naftilacetic* (ANA) și *acidul naftoxiacetic* (ANOA);

Formulă structurală	Denumire chimică	Solubilitate
 (Nativ) GM*=175,18	Acidul 3-indolilacetic (AIA)	Parțial solubil în apă și ușor solubil în alcool
 GM = 203,23	Acidul 3-indolilbutiric (AIB)	Parțial solubil în apă și ușor solubil în alcool
 GM = 186,20	Acidul 1-naftilacetic (ANA)	Insolubil în apă, solubil ușor în acetonă și eter
 GM = 221,04	Acidul 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4-D)	Insolubil în apă, solubil ușor în acetonă și eter
 GM = 186,60	Acidul 4-clorfenoxiacetic (4-ACFA sau ACPA)	Solubil în diluanți organici
GM = 202,20	Acidul 2-naftoxiacetic (ANOA)	Insolubil în apă, ușor solubil în alcool
 GM = 255,49	Acidul 2,4,5-triclorfenoxiacetic (2,4,5-T)	Solubil în solvenți organici
 GM = 221,48	**Acidul 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic DICAMBA**	Solubil în alcool și în acetonă
 GM = 241,48	Acidul 4 amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxilic (PICLORAM)	Solubil în apă
 GM = 200,62	**Acidul 2-metil-4-clorfenoxiacetic (AMCA)**	Solubil în apă ca sare de Na

*GM = greutate moleculară

Fig. 13. Principalele auxine naturale și de sinteză (după *Boxus* și colab. 1995)

3 – cu nucleu *clorfenoxiacetic: acidul 2,4 diclorfenoxiacetic* (2,4-D), *acidul 2,4,5-triclorfenoxiacetic* (2,4,5-T) și *acidul 2-metil-4-clorfenoxiacetic*;

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

4 – cu nucleu *benzoic: acizi 2,4,6* - sau *2,3,6 triclor-benzoici* şi *acidul 2-metoxi-3,6-diclorbenzoic* (*dicamba*); 5 – cu nucleu *picolinic: acidul 4-amino-3,5,6-tricloropicolinic* (PIC) (*picloram*) şi altele.

Acizii indolilbutiric şi *indolilpropionic* se pare că pot fi găsiți şi în natură, dar numai la unele specii vegetale (după *Moore*, 1989).

Auxinele intervin în numeroase procese fitofiziologice şi interacționează cu diferite substanțe endogene, în special cu alți fitohormoni, cu precădere cu citochininele, giberelinele şi cu etilena. *Acțiunea fiziologică a auxinelor* asupra plantelor, deşi este foarte complexă, o putem rezuma astfel: 1 – acționează asupra *creşterii în lungime a celulelor*, mărind plasticitatea pereților pectocelulozici ai acestora; 2 –*permeabilizează membranele plasmatice* pentru apă şi pentru anumiți ioni (facilitează desorbția de H^+ şi absorbția de cationi, îndeosebi a ionilor de K^+); 3 – exercită *influențe* favorabile asupra proteosintezei şi asupra *sintezei de ARN ribozomal*; 4 – alături de citochinine, auxinele *stimulează diviziunea celulară*; 5 – *influențează sinteza de etilenă*, iar etilena, la rândul ei, acționează în stabilirea nivelului endogen de auxină, precum şi transportarea acesteia prin corpul plantelor; 6 – influențează creşterea celulelor în *tropisme*; 7 – sunt implicate în stabilirea unor *corelații între organe*, mai ales în fenomenul de *dominanță apicală*, caulinară, exercitat de către mugurele apical; 8 – au acțiune *retardantă asupra căderii frunzelor* şi a *fructelor*; 9 – au o *acțiune rizogenă* netă, ceea ce face ca ele să fie frecvent utilizate în stimularea înrădăcinării butaşilor, în înmulțirea vegetativă; 10 – *inhibă formarea embrionilor somatici*, în suspensiile de celule etc.

Biogeneza auxinei este localizată, în general, în partea aeriană a plantelor, în mugurii activi, în meristemele foliare şi florale, în frunzele foarte tinere şi în fructele necoapte. Auxina circulă bazipetal, polarizat, înspre celulele tinere. În anul 1971, prin experimente efectuate cu culturi celulare de tutun (*N. tabacum* L) s-a dovedit, că în celulele vegetale triptofan-racemaza converteşte D-triptofanul în L-triptofan, unicul izomer al acestuia existent la plantele superioare.

Mereza, multiplicarea celulară şi *auxeza*, creşterea în lungime a celulelor se află sub control auxinic, în cazul merezei, citochininele acționând alături de AIA.

Mecanismele moleculare prin care AIA îşi exercită efectul auxogen nu sunt pe deplin elucidate. Încă *Söding* (1937) a arătat că, în creşterea în lungime a celulelor vegetale, AIA labilizează legăturile microfibrilelor de celuloză din peretele celular pectocelulozic. După *Moore* (1989), s-a dovedit experimental, pe culturi *in vitro*, că în decursul auxogenezei are loc o inten-

sificare a biosintezei de acizi nucleici şi de proteine. În celulele tinere, auxina nativă – AIA – poate fi degradată şi inactivată de către AIA-oxidază, reacţie prin care se intervine în diminuarea nivelului de AIA, din celule. Totodată, monofenolii (*kaemferolul*) activează, iar difenolii (*quercetolul*) inhibă, AIA-oxidază, în timp ce giberelinele inhibă, iar etilena stimulează activitatea acestei enzime. În menţinerea sau în decarboxilarea AIA intervin şi peroxidazele. În urma relaţiilor interfitohormonale, sau ale acestora cu alţi compuşi, rezultă efectele fiziologice mai mult sau mai puţin specifice ale auxinelor, fitohormoni care aplicaţi la un moment dat, într-o anumită conjunctură fiziologică, induc sau nu, anumite procese de creştere şi de morfogeneză, ori cauzează producerea altor fenomene specifice. La concentraţii mici, fiziologic stimulatoare (de 1.10^{-6} sau 1.10^{-8}), auxinele exercită o acţiune benefică asupra creşterii; aceiaşi compuşi, la concentraţii mai ridicate, pot produce un efect inhibitor sau pot fi chiar toxici (cum este cazul auxinelor de sinteză 2,4-D şi dicamba), drept pentru care auxinele de sinteză sunt utilizate ca *erbicide*. În general, decarboxilarea enzimatică a AIA este mai puternică în ţesuturile bătrâne, decât în cele tinere.

Dintre auxinele de sinteză, ANA şi 2,4-D-ul sunt mai stabile şi mai puţin supuse degradării endocelulare; AIA, nativ sau exogen, este fotooxidabil în timp, sub influenţa luminii el transformându-se în indolenin-epoxid, substanţă care poate fi descompusă enzimatic, cu formare de metil-3-oxindol sau de indolilaldehidă, compuşi lipsiţi de activitate auxinică; AIA poate fi anihilat fiziologic şi de radiaţiile ionizante, de razele UV şi de peroxizi. Viteza de degradare, ca – de altfel – şi capacitatea de acţiune, într-un anumit sens, a auxinelor, este dependentă de *tipul ţesutului* supus influenţei acestora, de *natura* şi *concentraţia* auxinei şi de *fenofaza* în care se găseşte planta sau organul aflat în atenţie. Astfel, rădăcinile sunt mai receptive la administrarea unor concentraţii scăzute de auxină, în timp ce tulpinile, frunzele şi fructele, în formare, reacţionează la concentraţii de auxină cu ceva mai ridicate. Între organele aceleiaşi plante, reacţia este diferită nu numai în funcţie de natura şi concentraţia auxinei, dar şi de combinaţiile realizate între variatele auxine (respectiv nivelul de AIA endogen şi o auxină administrată exogen), sau dintre ele şi alţi regulatori de creştere, în principal citochinine, fenomene mai evidente în cazul vitroculturilor. Diferenţe de reacţie, la tratamentele cu auxine, există şi în ceea ce priveşte receptivitatea selectivă a explantelor ori a organelor, în funcţie de gen, specie sau de genotip, în raport cu concentraţiile administrate, dar şi de apartenenţa speciilor la dicotiledonate sau monocotiledonate, fenomen care este exploatat practic în combaterea selectivă a buruienilor, în culturile agricole, prin aplicarea unor

doze ridicate de auxine, în erbicidarea buruienilor dicotiledonate din lanurile de cereale etc.

Se cunoaşte însă posibila reacţie morfogenă diferită a variatelor specii sau soiuri, în cazul unor explante omoloage (chiar şi la butaşi), tratate sau cultivate în prezenţa aceluiaşi fitoregulator auxinic, de concentraţie similară. Astfel, după cum se poate vedea în fig 14 (de comparat poziţiile A-C), ANA – în concentraţie de 2,5 mg/l – prezent în mediul de cultură în care au fost inoculate explante caulinare, internodale, de hortensie (poziţia A), la polul bazal al inoculilor auxina a determinat formarea unei mase compacte de calus, la nivelul acestuia instalându-se un proces de rizogeneză; la crizanteme (fig. 14, poziţia B) dintr-un explant de acelaşi tip s-a regenerat doar un calus compact, nerizogen, iar din fragmentele caulinare de garoafe a luat naştere un calus spumos şi friabil (fig 14, poziţia C).

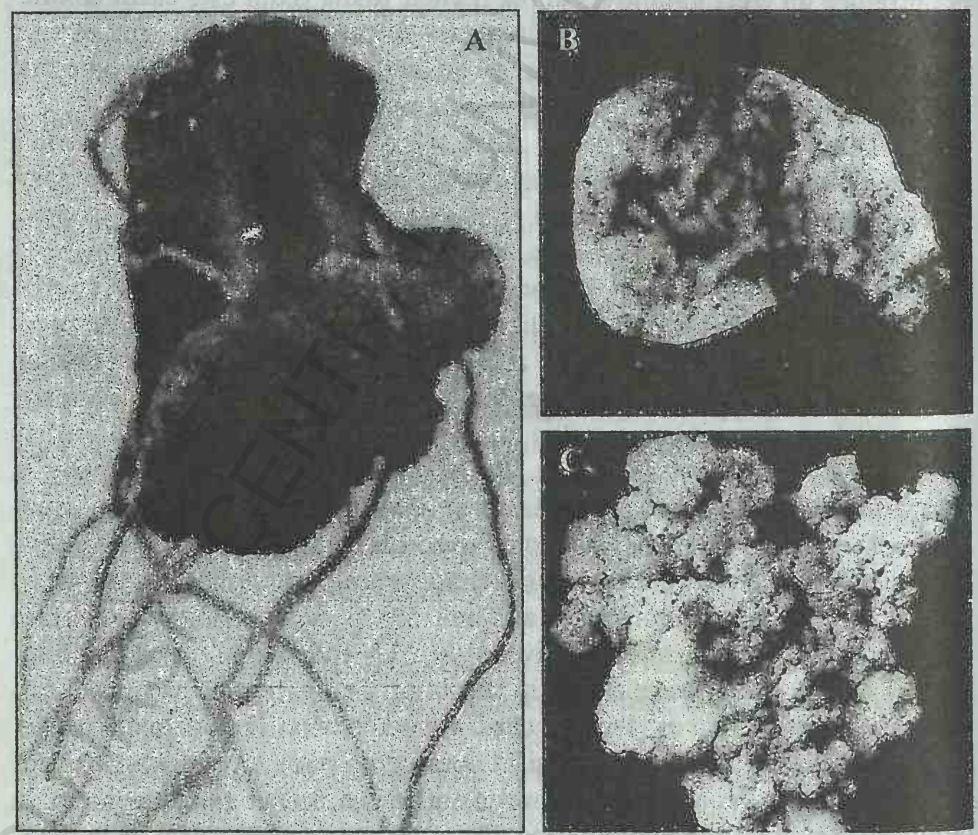


Fig. 14. Reacţia diferenţiată a inoculilor constând din segmante internodale de hortensie (A), de crizanteme (B), şi de garoafe (C), cultivate *in vitro* pe medii cu ANA 2,5 mg/l

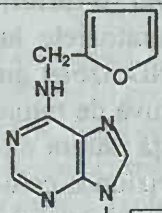
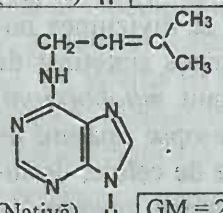
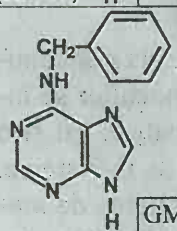
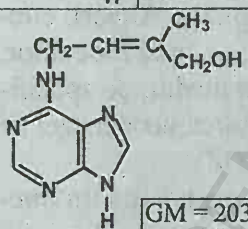
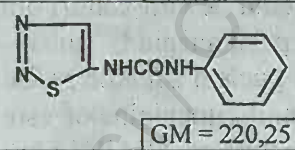
b. *Citochininele*

În anul 1955, a fost izolată prima citochinină – *chinetina* (6-furfurilaminopurina) (Kin) de către *Miller* şi colaboratorii, în laboratoarele lui *Skoog*. Acest compus a fost purificat dintr-un autoclavat de AND, izolat din spermă de heringi. Administrată într-o cultură de calus de măduvă de tutun, s-au remarcat influenţele pozitive exercitate de această substanţă asupra mitozei. *Skoog* şi *Miller*, au încadrat compuşii care provoacă diviziunea celulelor vegetale în grupa *citochininelor*, după modelul descris de ei în cazul chinetinei*. *Haberlandt* însă, în anul 1930, a intuit faptul că diviziunea nucleelor şi a celulelor plantelor este declanşată de un compus sintetizat de către celulele respective, substanţe pe care el le-a denumit *mitohormoni*. Abia în anul 1963, a fost izolată de către *Letham*, din cariopse imature de porumb (*Zea mays*), o substanţă care introdusă în culturile de celule, de tutun, a stimulat diviziunea acestora. Compusul a fost denumit *zeatină* [6-(hidroxi-3-metiltrans-2-butenilamino)-purina].

În absenţa citochininelor, celulele nu se divid. În prezenţa concomitentă a unei citochinine şi a unei auxine, la nivelul cormofitoinoculior se înregistrează atât un proces de multiplicare a celulelor meristematice, cât şi o dediferenţiere a unora dintre celulele diferenţiate, cu formare de meristeme. Dar, citochininele stimulează şi *caulogeneza*, respectiv neoformarea de *muguraşi*, la nivelul inoculilor, din aceştia generându-se tulpinişe. Alteori, citochininele – în funcţie de natura acestora, de concentraţie, de tipul inoculilor, de raportul dintre acestea şi alţi fitoregulatori existenţi în mediu, de specificul culturii – ele pot provoca formarea de calus şi declanşarea neogenezei de embrioni somatici, mai ales în prezenţa *tidiazuronului* (TDZ).

În general, citochininele sunt adenine substituite, ce posedă un *nucleu purinic*. *Skoog* şi colaboratorii (1967), experimentând pe vitroculturi din măduvă de tutun, au ajuns la concluzia că numai compuşii adenin N^6 substituiţi deţin activitate citochininică; dacă substituirile la nucleul adenilic se fac în altă poziţie, efectul citochininic scade. Metabolismul citochininelor este strâns legat de metabolismul acizilor nucleici, în special de cel al ARN-ului. La numai trei luni de la izolarea chinetinei, s-a reuşit sintetizarea *benziladeninei* (denumire similară: benzilaminopurina – abreviat BAP ori BA). Din marele număr de derivaţi cu nucleu purinic, în fitovitrocultură sunt utilizaţi, mai frecvent, următorii compuşi citochininici: *2-izopenteniladenina* (2 iP) şi *zeatina* (Z), ca citochinine *naturale*, *chinetina* (K sau Kin) şi *benziladenina* (BA), ori *tidiazuronul*, ca citochinine de *sinteză* (vezi fig. 15).

* în gr. *cytokinesis* = diviziunea celulară

Formulă structurală	Denumirea chimică	Solubilitate
 (Nativă) GM*=215,21	CHINETINA (KINETINA) (K sau Kin) (6-furfurilaminopurina N^6 furfuriladenina)	Se solvă uşor în H Cl sau în NaOH diluat
 (Nativă) GM = 219,25	ZEATINA (Z) (4 - hidroxi-3-metil-trans-2 butenilaminopurină)	Se solvă uşor în H Cl sau în NaOH diluat
 GM = 225,26	BENZILADENINA (BENZILAMINOPURINA) [6-benzilaminopurină (BAP) sau benziladenină (BA)]	Se solvă uşor în H Cl sau în NaOH diluat
 GM = 203,25	IZOPENTENILADENINA (2iP) [N^6 (2-isopentil)adenina sau 6-γγ-dimetilalilaminopurina]	Se solvă uşor în H Cl sau în NaOH diluat
 GM = 220,25	TIDIAZURON (TDZ) [1-fenil-3-(1,2,3 tiadiazol-5)]	Se solvă în apă

*GM = greutate moleculară

Fig. 15. Principalele citochinine naturale şi de sinteză (după *Boxus* şi colab., 1995)

Citochininele, spre deosebire de auxine, din punct de vedere chimic reprezintă un grup mai omogen de compuşi. Citochininele native sunt prezente în numeroase extracte vegetale, cum ar fi: în extractele preparate din drojdia de bere sau din germenii de porumb, dar şi în laptele din nucă de

cocos, fapt care explică rezultatele bune obţinute în generarea de muguraşi, în cazul multor vitroculturi vegetale, pe medii cu astfel de adaosuri, chiar şi în absenţa chinetinelor de sinteză.

Efectele fitofiziologice ale citochininelor, în mare, pot fi rezumate astfel: 1 – *impulsionează diviziunea celulară*, determinând o întinerire a ţesuturilor şi organelor, eficienţa maximă fiind asigurată de prezenţa auxinei în celule, întrucât auxina favorizează duplicarea AND-ului, iar chinetina separarea cromozomilor; 2 – citochininele, în funcţie de concentraţie şi de tipul acestora, în vitrocultură, stimulează formarea de muguraşi şi de tulpiniţe (*caulogeneză* – fig. 16A), fiind antagoniste rizogenezei (fig, 16B); 3 – *stimulează proteosinteza* (au fost găsite citochinine legate de ARN-ul de transfer); 4 – *protejează* compuşii endogeni rezultaţi din metabolism, de acţiunea hidrolazelor, fapt care le conferă un rol important în *prevenirea senescenţei*; 5 – exercită *efect antagonic* auxinelor, *anihilând dominanţa apicală* a mugurelui terminal (mugurii axilari trataţi cu citochinine intră în creştere activă, în competiţie cu mugurele terminal; dar, odată cu înlăturarea citochininei, creşterea acestora încetineşte şi, treptat, ea se opreşte, mugurii reintrând sub incidenţa acţiunii inhibitoare a mugurelui apical); 6 – citochininele servesc la menţinerea viabilităţii celulelor, *susţinând capacitatea de supravieţuire* a cormofitoinoculilor, *favorizând dediferenţierea* şi *multiplicarea celulară*; 7 – previn senescenţa.

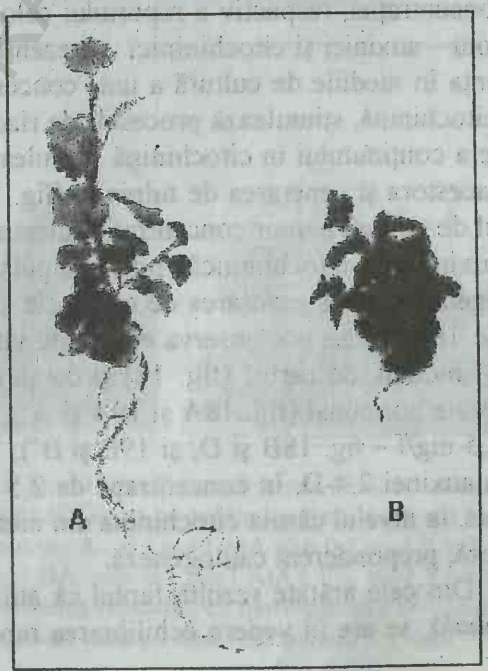


Fig. 16. Fragmente de peduncul floral de *crizanteme* cultivate "in vitro" pe mediu de bază cu excedent de auxină (ANA 2,5 mg/l plus BA 0,1 mg/l) (A), şi (B) cu excedent de citochinină (BA 2,5 mg/l) şi 0,1 mg/l ANA

Biosinteza citochininelor este localizată în rădăcini și în embrioni, respectiv în meristeme. Din apexurile radiculare ele sunt translocate, prin vasele lemnoase, în întreg corpul plantei. Spre deosebire de auxine, citochininele *nu circulă polarizat* în plantă; în cursul migrației, ele sunt legate de un glucid sau îmbracă o formă inactivă. De regulă, concentrațiile sub care citochininele sunt utilizate mai frecvent, în mediile destinate vitroculturilor vegetale, sunt cele cuprinse între 0,1-20 mg/l (sau 10^{-2} –10^{-7} M), cu precădere în diluții mai mari.

În general, citochininele suportă bine autoclavarea, ele fiind termostabile.

Trebuie subliniat efectul fiziologic combinat al auxinelor și citochininelor, alcătuind ceea ce – în tehnica culturilor de țesuturi și celule vegetale – poartă denumirea de *balanță hormonală*, chiar și în cazul raportului realizat de regulatori de creștere care dețin proprietăți auxinice sau citochininice. În anul 1957, *Skoog* și *Miller* au fondat conceptul de control fitohormonal al organogenezei, demonstrând experimental faptul că diferențierea rădăcinițelor și cea a tulpinițelor – într-o cultură de calus provenită din măduvă de tutun – a fost dependentă de raportul auxină/citochinină, prezent în mediu.

La vitroculturile vegetale, organogeneza poate fi reglată, între anumite limite (reacția depinzând de factori de natură endogenă), prin schimbarea concentrației, respectiv a raportului celor două tipuri principale de fitohormoni – auxinici și citochininici – prezenți în substratul de cultură. Astfel, existența în mediile de cultură a unei concentrații sporite de auxină, alături de o citochinină, stimulează procesele de rizogeneză (fig. 16A), în timp ce o mărire a conținutului în citochinină stimulează formarea de muguraşi, creşterea acestora și generarea de tulpinițe (fig. 16B); în schimb, în prezența în mediul de cultură a unor concentrații ridicate, dar egale, de compuși cu acțiune auxinică și citochininică, poate impulsiona – alături de procesele de morfogeneză – atât generarea de calus, cât și creșterea acestuia (fig. 17). În figurile 18 și 19 se pot observa evoluțiile vitroculturilor realizate din minibutaşi binodali, de cartof (fig. 18) și de *stevia* (fig. 19) inoculați pe medii echilibrate hormonal (fig. 18A și 19A și A'), sau cu excedent de citochinină (BA 2,5 mg/l – fig. 18B și D, și 19B și B'); la cartof, prezența în mediul de bază a auxinei 2,4-D, în concentrație de 2,5 mg/l (fig. 18C), a indus forme de calus, la nivelul căruia citochinina din mediu a declanşat procese de morfogeneză, preponderent caulogeneză.

Din cele arătate rezultă faptul că atunci când ne referim la *balanța hormonală*, se are în vedere echilibrarea raportului auxină/citochinină, res-

pectiv a regulatorilor de creştere administraţi exogen, în mediul de cultură. Dar, comportamentul cormofitoinoculilor – în dependenţă de balanţa hormonală din mediul de cultură – va fi influenţat, într-o foarte mare măsură şi de raportul fitohormonal *endogen*, manifestări care vor fi particulare, ca formă de exprimare, în funcţie de *tipul* de vitrocultură, *natura* explantelor sau a inoculilor, starea lor fiziologică, chimismul *regulatorilor* de *creştere*, felul şi concentraţia acestora, amestecurile realizate şi în ce proporţii, precum şi de *interferenţa* regulatorilor de creştere introduşi în mediul de cultură şi *conţinutul* fitohormonal *endogen*.

Fig. 17. Apexuri caulinare de *forsiţia*, cultivate pe medii de bază cu un conţinut ridicat în auxină şi în citochinină (câte 1 mg/l), într-o fază timpurie (A) sau mai avansată de vitrocultură (B), şi cu rizogeneză ce se poate extinde şi în porţiunea bazală a tulpinităelor (B)

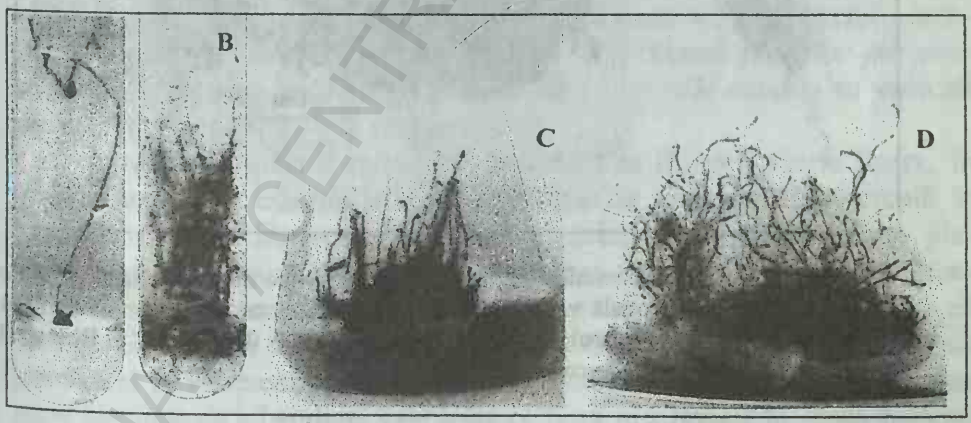


Fig. 18. Vitroculturi de cartof având ca inocul iniţial un minibutaş binodal, orientat în poziţie verticală (A) sau orizontală (C,D), pe un mediu agarizat, după trei luni de cultură, pe medii de bază cu adaos de: A – 0,1 mg/l AIA plus 0,1 mg/l BA; B – cu excedent de citochinină (2,5 mg/l BA, plus 0,1 mg/l AIA); C – cu 2,5 mg/l BA plus 2 mg/l 2,4-D (de remarcat prezenţa calusului, cu morfogeneză); D – neogeneză de tulpinişe, fără calus şi cu rizogeneză slabă pe medii exclusiv cu Z 1 mg/l

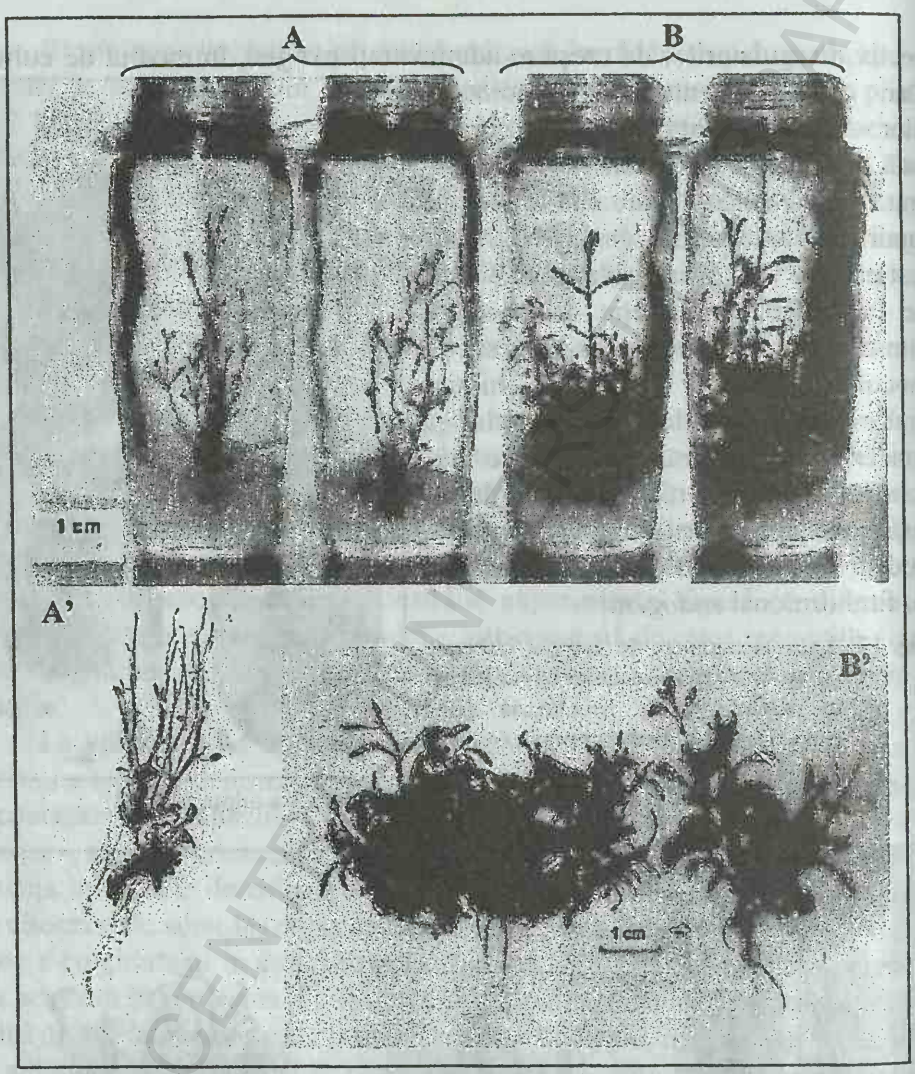


Fig. 19. Vitroculturi de minibutaşi binodali de *stevia* pe medii agarizate având o balanţă hormonală variată: A – mediu de bază cu adaos de ANA şi BA (câte 1 mg/l, fiecare); B – BA 2,5 mg/l plus ANA 0,1 mg/l; A' şi B' inoculi scoşi din vasele de cultură

c. *Giberelinele*

Giberelinele sunt fitohormoni de mai mică importanţă pentru vitroculturile vegetale, ele alcătuind un grup de compuşi bioefectori cu acţiune fitofiziologică diferită de aceea exercitată de auxine sau de citochinine şi au fost descoperite în anul 1926, de către *Kurosawa*. Ele au fost identificate ca

fiind prezente în mediul de cultură al ciupercii *Gibberella fujikuroi*, eliberate fiind în substratul de cultură, de către miceliul acesteia.

Giberelina a fost izolată şi a fost purificată, abia în anul 1935, de către *Yabuta* şi Sumiki, din filtrat de culturi de *Gibberella*. Ulterior, au fost descrişi peste 50 de compuşi giberelici, care deţin în molecula lor *scheletul gibanic*. Dintre aceştia, acidul giberelic (AG_3) (fig. 20) s-a dovedit a fi cea mai activă giberelină, ea fiind cea mai frecvent utilizată în practica agricolă, mai puţin în vitroculturi. *Acţiunea fitofiziologică a giberelinelor*, în mare, poate fi rezumată astfel: 1 – produc auxeza şi mereza, respectiv *alungirea internodiilor tulpinilor* şi a rahisurilor inflorescenţelor, servind – alături de alţi fitohormoni – la înlăturarea fenomenelor de *nanism*; în auxează acţiunea lor este indirectă, prin stimularea biosintezei triptofanului (precursor al AIA), dar inhibă şi acţiunea AIA-oxidazei, intensitatea procesului depinzând de vârsta şi stadiul de dezvoltare al plantelor sau al organelor, ele jucând un rol important în *reglarea nivelului endogen de auxină*, fie prin intervenţii directe, exercitate asupra procesului de biosinteză a acesteia, fie inhibând acţiunea AIA – oxidazei; 2 – exercită un rol complex în *suprimarea latenţei* instalate în seminţe, muguri sau în organele de rezervă; 3 – exercită o *acţiune complexă în anteză*; 4 – joacă un rol în *formarea fructelor partenocarpice*, dar şi în *germinaţia seminţelor* etc.; 5 – AG_3 exogen nu exercită nici un fel de acţiune asupra rizogenezei.

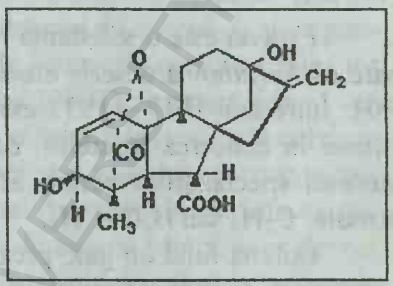


Fig.20. Formula acidului giberelic (AG_3)

Biogeneza giberelinelor este localizată în frunzele foarte tinere, în mugurii activi, în extremităţile rădăcinilor şi în embrioni. Ele circulă în plantă prin vasele liberiene. Atunci când cerinţele fiziologice impun prezenţa giberelinei active, se produce o hidroliză a formelor inactive de giberelină şi se eliberează AG_3 activ. În cazul giberelinelor legate, se pare că acestea sunt blocate de o proteină, întrucât celulele respective tratate fiind cu proteinază se eliberează giberelina liberă, activă. Seminţele conţin cea mai mare cantitate de gibereline, cele imature fiind mai bogate în aceşti fitohormoni; pe măsura coacerii seminţelor activitatea giberelinelor descreşte, posibil ca urmare a conjugării lor cu glucoza, formele conjugate (glucozidate) fiind fiziologic inactive.

În vitrocultură, giberelinele sunt utilizate numai atunci când se doreşte o favorizare a alungirii meristemelor caulinare, apicale; în absenţa

AG_3 din substratul de cultură, meristemele caulinare, apicale, prezintă uneori o creştere globulară; adaosul de giberelină face ca miniinternodiile meristemelor caulinare să se alungească, motiv pentru care, *Morel* şi *Muller* 1964) au introdus AG_3 în mediul de cultură pe care au fost cultivate explantele meristematice de cartof.

d. *Etilena*

Etilena este o substanță relativ recent recunoscută ca fitohormon, cu toate că *Neljubov* a descris efectele fitofiziologice ale acesteia, încă în anul 1901. Între anii 1917 – 1937 existau referiri bibliografice cu privire la rolul etilenei în coacerea fructelor, dar abia din anul 1959 a început să crească interesul specialiştilor pentru această hidrocarbură nesaturată, gazoasă, cu formula: C_2H_4 sau $H_2C=CH_2$.

Etilena fiind un gaz, prezența ei în celule a fost greu de identificat şi de măsurat, cu atât mai mult cu cât, în plante etilena se produce în cantități foarte mici, doar fructele – în curs de coacere – emanând etilenă în cantități mai mari. Ea are ca precursor metionina şi este sintetizată în toate organele plantelor. Auxinele naturale sau de sinteză stimulează biogeneza de etilenă.

Efectele fitofiziologice ale etilenei sunt multiple şi încă incomplet cunoscute. Căile metabolice şi acțiunea fitofiziologică a acestui compus se intersectează cu multe alte procese fiziologice şi biochimice din celulele plantelor şi din corpul lor. În general, în viața plantelor etilena îndeplineşte următoarele principale *funcțiuni*: 1 – exercită un *control* asupra creşterii *permeabilității membranelor plasmatice*; 2 – *stimulează căderea frunzelor, coacerea* şi *căderea fructelor*; 3 – influențează *deschiderea florilor*, dar şi ofilirea şi decolorarea acestora; 4 – induce *senescența țesuturilor*; 5 – este implicată în *transportul auxinei*; 6 – celulele *traumatizate* produc şi emană etilena; 7 – stimulează *rizogeneza* adventivă, dar *inhibă* creşterea în lungime a rădăcinilor şi *participă* la orientarea geotropic, normală, a acestora; 8 – stimulează *creşterea izodiametrică* a celulelor, acționând direct asupra dispunerii microfibrilelor de celuloză, în peretele celular etc.

În vitroculturi, etilena a fost mai puțin utilizată, probabil din cauza noutății acceptării sale ca fitohormon, dar şi a dificultății de administrare a acesteia în mediile de cultură, în concentrații strict controlabile, gaz fiind, ea difuzează uşor din recipientele de cultură. Administrarea exogenă de etilenă se face sub formă de soluție de acid 2-cloroetilfosfonic (ACEP), care se descompune – în timp – în *etilenă* şi în acid fosforic; asepsizarea acestuia se poate face prin filtrare, cu filtre Millipor.

În condiții normale de vitrocultură, s-a constatat că etilena este prezentă în recipiente şi exercită efecte din cele mai diverse. Ea provine din metabolismul endogen al celulelor cormofitoinoculilor; în cazul recipientelor obturate cu folie de polietilenă, etilena (probabil) poate fi emanată – în timp – şi din astfel de folii, mai ales la temperaturi ridicate (notă personală).

În anul 1968, *Gamborg* a semnalat prezența etilenei şi în recipientele cu suspensii celulare, vegetale,iar *Fuchs* şi *Lieberman* au subliniat efectele AIA, ale chinetinei şi cele ale AG_3, asupra sintetezei de etilenă, la vitroplantule, şi au atras atenția asupra fenomenelor de interacție existente între toți acești fitohormoni. Ulterior, *Gamborg* şi *Larue* (1971) au reluat aceste cercetări şi au urmărit elaborarea şi emanarea de etilenă în suspensiile celulare, vegetale, legat de acțiunea auxinei, a chinetinei şi a acidului abscisic, subliniind faptul că sub influența AIA şi a chinetinei (prezente în mediile de cultură), are loc o substanțială sporire a nivelului de etilenă (din *Taiz* şi *Zeiger*, 1991). *Street* (1973), a sesizat şi el faptul că suspensiile celulare, provenite de la diferite specii vegetale, produc etilenă. Acumularea unei cantități maxime de etilenă a corespuns cu o fază intensă de diviziune mitotică a celulelor aflate în cultură. După atingerea pragului maxim de multiplicare celulară, în culturi se instalează rapid un fenomen de reprimare a producerii de etilenă; nu a existat însă nici un indiciu a faptului că etilena ar fi fost cauza inhibării creşterii culturilor. Ulterior, *Street* (1976) a menționat faptul că, într-o suspensie fină de celule de *Spinacea oleracea*, producția de etilenă a fost antagonistă fenomenului de înverzire a culturilor; pentru a contracara efectul negativ exercitat de etilena acumulată în recipiente (5-20 mg/l), asupra culturilor de celule, a fost necesară o ridicare a concentrației de CO_2, din vasele de cultură, la 5-10%.

Apoi, *Tisserat* şi *Murashige* (1977) şi, ulterior, *Dunwell* (1979) au semnalat, sub influența etilenei, inhibarea proceselor de embriogeneză somatică, la culturile celulare de morcov, tutun şi citrice (*Taiz* şi *Zeiger*, 1991).

După *Osborne* (1976, din *Street*, 1977b) este posibil ca gradientul de auxină, şi interacționarea acesteia cu etilena, să exercite un control asupra ratei şi amplitudinei creşterii celulare, şi chiar ca etilena să constituie un factor critic în morfogeneză, respectiv în manifestarea acesteia, sub raport calitativ şi cantitativ.

Între anii 1975 – 1977, *Steward* şi *Phsu* au făcut o serie de experiențe cu acid 2-cloroetilfosfonic (ACEP), compus care – în concentrație de 40%, în amestec cu substanțe de condiționare – a primit denumirea comercială de Ethrel sau Etefon (regulator de creştere deosebit de valoros, cu aplicații practice în cultura legumelor, în floricultură, pomicultură şi în

viticultură) şi în cultura mare (la plantele tehnice şi cerealiere, a cartofului, a tutunului, bumbacului etc.). Efectele Ethrelului asupra creşterii, a înfloririi şi a fructificării plantelor, sunt dependente – în primul rând – de doza administrată şi de fenofază (*Taiz* şi *Zeiger*, 1991).

Ethrelul, introdus în mediul de cultură utilizat pentru creşterea *in vitro* a ovulelor excizate, mature, de bumbac, a inhibat evoluţia normală a acestora, stimulând formarea de calus, în lipsa din mediu a altor fitohormoni sau regulatori de creştere. Totodată, *Kochba* şi colaboratorii (1978) au semnalat, pe medii cu Ethrel, o stimulare a creşterii explantelor tisulare de *Citrus*. Ulterior, *Wulster* şi *Sacalis* (1980), experimentând cu calus de *Rosa*, cultivat în prezenţa *auxinelor* (AIB sau ANA) şi a *citochininelor* (BA, a dimetilalilaminopurinei – abreviat DMAA – şi a zeatinei), au observat o producţie crescută de etilenă, la un aport sporit de auxină în mediul de cultură; *citochininele* singure nu au indus o creştere a biogenezei de etilenă. Faţă de calusurile crescute pe substrat lipsit de fitohormoni sau de regulatori de creştere (mediu control), cel cultivat pe mediile de cultură a 3 mg/l ANA a manifestat o sporire semnificativă a producţiei de etilenă, nivelul de etilenă scăzând, însă, în momentul în care calusul a încetat să mai crească. Creşterea nivelului de etilenă în vasele de cultură nu a influenţat negativ dezvoltarea calusului, respectiv creşterea acestuia în volum sau în greutate (*Taiz* şi *Zeiger*, 1991)

Mattoo şi *Lieberman* (1977) au sugerat faptul că, sinteza de etilenă este localizată la nivelul interfeţelor dintre peretele celular şi protoplasmă. Ei au observat că, în comparaţie cu suspensiile celulare de măr, o suspensie de protoplaşti produce foarte puţină etilenă. Capacitatea de sintetiză a etilenei fiind redobândită în momentul în care protoplaştii au început să-şi regenereze peretele celular (*Fuchs* şi *Chalutz*, 1984).

Kevers şi *Gaspar* (1985a), studiind fenomenul de *vitrificare* (hiperhidrie), au observat că etilena – la vitroplantulele vitrificate – produce o stimulare a lignificării vaselor lemnoase şi o rigidizare a pereţilor celulelor parenchimatice. Autorii citaţi, experimentând cu explante constând din noduri de *Dianthus caryophyllus* (cultivate pe medii lichide sau pe medii solide), au constatat că, pe medii lichide, în primele patru zile de cultură, în recipientele cu ţesuturi vitrificate, etilena s-a acumulat în cantitate mare, pentru ca apoi producţia de etilenă – în flacoanele cu material biologic vitrificat (hiperhidric) – să descrească, chiar şi în cazul în care ţesuturile vitrificate au fost subcultivate zilnic pe un mediu de cultură proaspăt; în general, pe mediile lichide emisia de etilenă a fost mai mare, decât nivelul de etilenă înregistrat în recipientele în care culturile au fost efectuate pe medii identice,

dar agarizate. Inocularea unor explante similare pe mediu solid, nu a condus la o vitrificare a acestora, producția lor de etilenă crescând moderat, din prima și până în cea de a 12-a zi de cultură, nivelul concentrației de etilenă, în vitroculturile cu țesuturi vitrificate (cum au fost cele de pe mediile lichide), situându-se cu mult sub cantitatea de etilenă emanată în primele patru zile de cultură. Trecerea vitroculturilor de pe mediu solid, pe mediu lichid, a condus la o creștere rapidă a producției de etilenă, fapt considerat ca fiind o reacție de răspuns a acestora la condiții de stres. Dar, o creștere a concentrației de etilenă în atmosfera din recipientele în care au fost cultivate explante de garoafe, pe medii solidificate, nu a cauzat o vitrificare a culturilor. În consecință, etilena administrată exogen nu este sigur că poate provoca aceleași modificări (de exemplu vitrificare), ca și compusul respectiv sintetizat endogen de către celulele cormofitoinoculilor. Totodată, autorii au apreciat că peroxidazele membranare sunt implicate în biosinteza etilenei.

Într-un articol din revista Agricell Report (decembrie, 1984) se făceau referiri cu privire la trei comunicări care au pus într-o nouă lumină influența exercitată de către etilenă, la plante, în controlarea proceselor regenerative. În articol se sublinia faptul că etilena joacă un rol de frunte (poate capital) în rândul fitohormonilor, aceasta având o importantă contribuție în controlarea proceselor regenerative, în embriogeneza somatică și în morfogeneză. Astfel, *Van Aartrijk*, experimentând cu explante constând din solzi de bulbi de *Lilium speciosum*, a observat că adăugarea de etilenă, într-o fază timpurie de cultură, a stimulat – în prezența ANA – neoformarea de plantule; temperaturile ridicate, sau rănirea țesuturilor care urmează să fie inoculate *in vitro*, au provocat un efect similar, considerat ca fiind datorat măririi sintezei de etilenă, biogeneză care – după opinia autorului – la nivelul explantelor de acest tip, a jucat un rol crucial, în primele faze ale proceselor regenerative. Experimentându-se cu o suspensie celulară de morcov, s-a constatat că *putresceina* și *arginina* blochează biosinteza de etilenă. În celulele vitroculturilor, realizarea unui control asupra biogenezei de etilenă, prin intermediul poliaminelor, poate să joace un rol considerabil în dirijarea proceselor de embriogeneză somatică, în sensul sincronizării dezvoltării embrionilor aflați la un moment dat în cultură, manipulând evoluția acestora prin intermediul compușilor organici prezenți în mediu.

Un alt aspect, legat de efectele citofiziologice ale etilenei, constă în demonstrarea dependenței *xilogenezei* de prezența etilenei în mediul de cultură, la explantele constând din țesut parenchimantos, medular, de *Lactuca sativa*, precum și a rolului jucat de precursorii acesteia (sau de către inhibitorii etilenei), asupra diferențierii celulare și a xilogenezei. Astfel, *Miller*

(1984) a constatat că formarea de xilem, în explantele medulare de salată, a crescut pe măsură ce mediilor de cultură le-au fost adăugați precursori ai etilenei, respectiv acidul 1-aminociclopropan-1-carboxilic (abreviat ACC), ori L-metionina, sau chiar acid 2-cloroetilfosfonic (ACEP), măsură care a avut ca efect ridicarea producției de etilenă în recipientele cu vitroculturi. În schimb, introducerea în mediile de cultură a unor inhibitori ai etilenei, aminoetoxivinglicina sau $Co(NO_3)_2$, a condus la o inhibare a producerii de etilenă, de către țesuturile aflate în cultură, dar și a xilogenezei. În absența unei auxine și a unei citochinine, L-metionina, ACC și etilena nu au mai fost eficiente în xilogeneză. Reluându-și experiențele, *Miller* și colaboratorii (1985), și-au completat observațiile, dovedind rolul jucat de către etilenă în controlarea xilogenezei, prin intermediul peroxidazelor de membrană. În urma acestor cercetări a reieșit faptul că aminoetoxivinglicina, ionul Co și cel de Ag inhibă atât producerea de etilenă, cât și xilogeneza. Adăugarea exogenă de L-metionină sau de ACEP a provocat o reversare totală a efectului inhibitor exercitat de ionii de Co și de Ag, în diferențierea xilemului și a activității peroxidazelor de membrană (*Taiz* şu *Zeiger*, 1991).

Efectele fitofiziologice ale etilenei, provenită din descompunerea în timp a ACEP, ne-au preocupat și pe noi (vezi *Cachiță*, 1987). Prin cercetările noastre am dovedit că acțiunea organogenă (rizogenă sau caulogenă) produsă de etilenă a depins, în mare măsură, de specie, de concentrația de ACEP și de tipul de inocul. Astfel, concentrațiile de 1 și 0,1 mg/l ACEP, după cum rezultă din figura 21A-C, la meristemele de *garoafe* și la propagulii de *gerbera*, au stimulat proliferarea caulinară, adventivă; la explantele discoidale, dimensionate din minituberculi de *cartofi* generați *in vitro* (fig. 22A), ACEP a stimulat atât caulo- cât și rizogeneza, în timp ce la protocormii de *cimbidium* (fig. 22B) și la minibutașii apicali de *crizanteme* (fig. 23), mai ales la concentrația de 0,1 mg/l, ACEP a stimulat creșterea plantulelor, în ansamblul lor. Deci, ACEP-ul a exercitat fie o acțiune de tip auxinic, fie de tip citochininic, în funcție de natura inoculului, ceea ce ne face să credem că, probabil etilena interferează cu căile de acțiune ale fitohormonilor nativi, reacția manifestată *in vitro* de către variatele specii de cormofitoinoculi, de tipuri diferite, fiind dependentă de rezultanta acestei interrelații.

Este neîndoielnic faptul că etilena și ACEP acționează pe un anumit fond fitohormonal, endogen, iar diferitele rezultate obținute în ceea ce privește morfogeneza (fie de stimulare cu preponderență a rizogenezei, fie de inducere a formării de mugurași și de tulpinițe adventive) depind de specie, de soi, de recepționarea diferențiată – la nivel celular – a influenței exercitate de către ACEP (respectiv de către etilena eliberată de acesta, în

substratul de cultură sau în atmosfera din recipientul de cultură), impulsurile metabolice primite traducându-se prin prisma particularităților genetice.

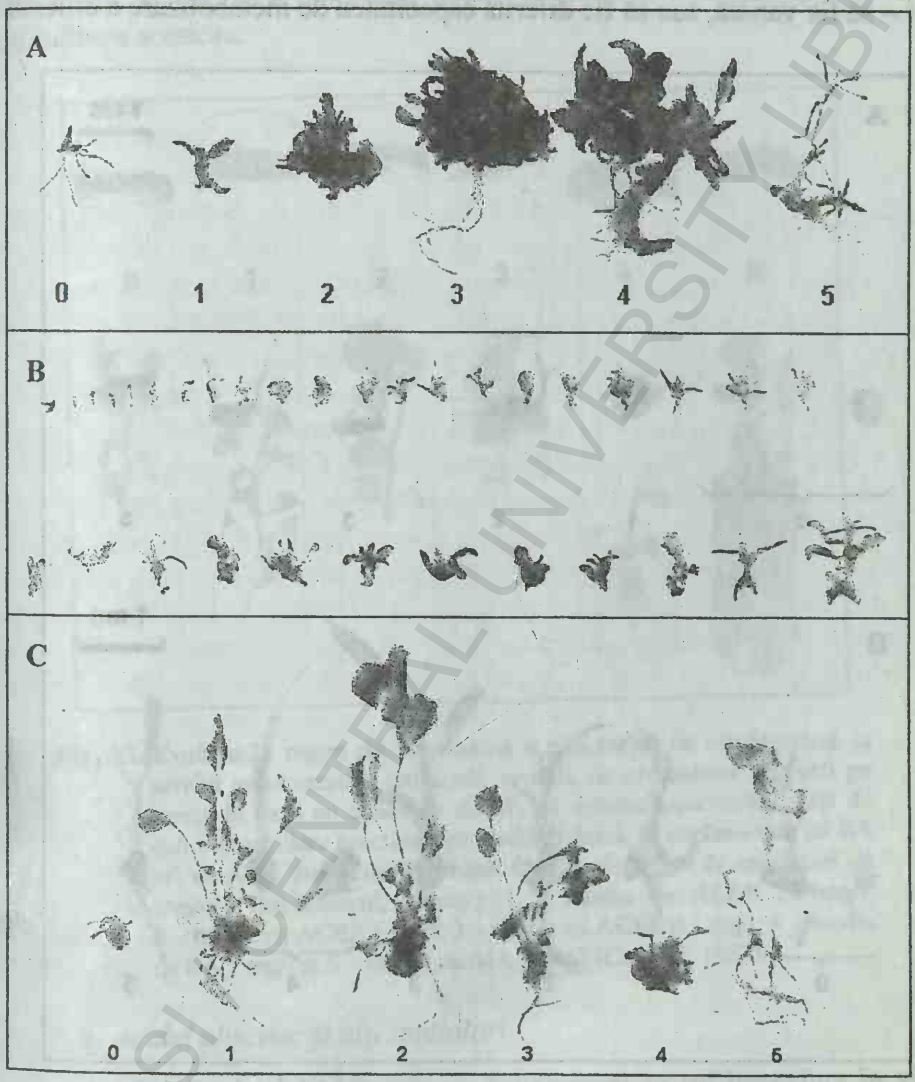


Fig. 21. Evoluția în regim de vitrocultură a proceselor de morfogeneză la nivelul apexurilor caulinare de *garoafe* (A – cultura în ansamblul ei și B – tulpinițe dezmembrate din inoculul cc a proliferat mugurași, pe varianta 3, cu ACEP 0,1 mg/l) și a propa-gulilor de *gerbera* (C), cultivați pe medii de bază cu adaos de ACEP, de diferite concentrații, față de culturile similare practicate pe medii de bază în exclusivitate cu BA, ori cu AIA, după cum urmează: 0 – mediu lipsit de regulatori de creștere (lot control, martor); 1 – mediu cu ACEP 10 mg/l; 2 – mediu cu ACEP 1 mg/l; 3 – mediu cu ACEP 0,1 mg/l; 4 – mediu cu BA 1 mg/l și 5 – mediu cu AIA 1 mg/l (*Cachiță* 1987)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Totodată, este posibil ca şi capacitatea de permeabilitate a celulelor faţă de ACEP sau de etilenă – în ţesuturile şi celulele diferitelor tipuri de vitroculturi – să fie variată, sau să fie diferită capacitatea de metabolizare a etilenei

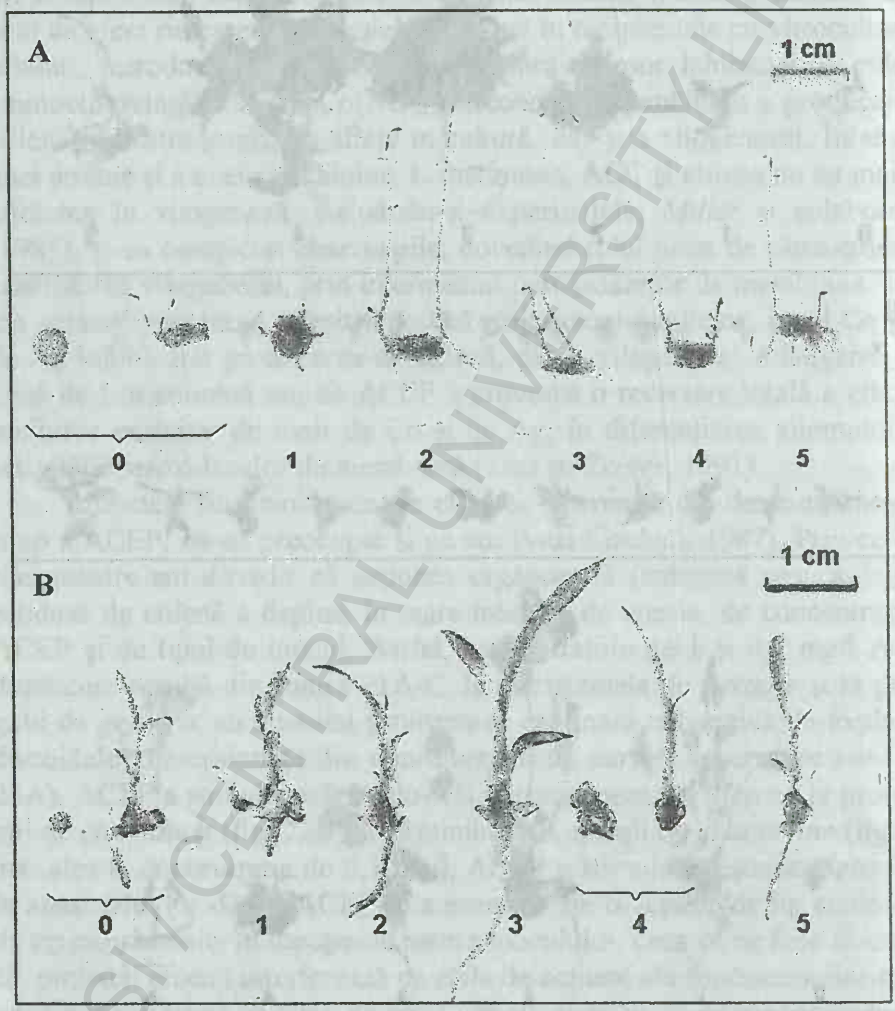


Fig. 22. Evoluţia în regim de vitrocultură a proceselor de morfogeneză la nivelul *minibutaşilor* discoidali de *cartof* (A) dimensionaţi din minituberculi generaţi *in vitro*, sau a *protocormilor de cimbidium* (B), cultivaţi pe medii de bază cu adaos de ACEP, de diferite concentraţii, faţă de culturile similare practicate pe medii de bază, în exclusivitate cu BA ori cu AIA, după cum urmează: 0 – mediu lipsit de regulatori de creştere (lot control, martor); 1 – mediu cu ACEP 10 mg/l; 2 – mediu cu ACEP 1 mg/l; 3 – mediu cu ACEP 0,1 mg/l; 4 – mediu cu BA 1 mg/l şi 5 – mediu cu AIA 1 mg/l (*Cachiţă*, 1987)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în celulele vegetale aflate în condiţii particulare de cultură. În general, concentraţia ACEP nu a modificat natura proceselor de organogeneză, ci amplitudinea acestora.

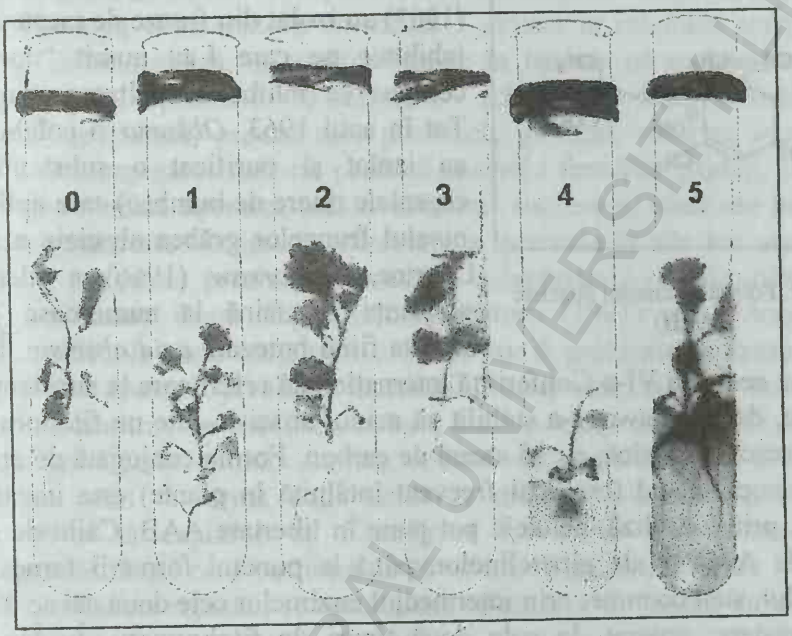


Fig. 23. Evoluţia în regim de vitrocultură a proceselor de morfogeneză la nivelul *minibutaşilor* uninodali, apicali, de *crizanteme* cultivaţi pe medii de bază cu adaos de ACEP, de diferite concentraţii, faţă de culturile similare practicate pe medii de bază, în exclusivitate cu BA ori cu AIA, după cum urmează: 0 – mediu lipsit de regulatori de creştere (lot control, martor); 1 – mediu cu ACEP 10 mg/l; 2 – mediu cu ACEP 1 mg/l; 3 – mediu cu ACEP 0,1 mg/l; 4 – mediu cu BA 1 mg/l şi 5 – mediu cu AIA 1 mg/l (*Cachiţă*, 1987)

e. *Acidul abscisic şi alţi inhibitori*

*Acidul abscisic** (*AAB*) este un fitohormon cu rol important în viaţa cormofitelor, acesta exercitând, preponderent, o influenţă inhibitoare asupra creşterii şi dezvoltării embrionilor, mugurilor şi a meristemelor, aflate într-un anumit moment al dezvoltării lor fiziologice, el fiind implicat în procese de latenţă a organelor de rezervă, a mugurilor şi a seminţelor. În concentraţii

* în lat. *abscidere* = a tăia, a despărţi

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

scăzute, AAB anihilează efectele AIA și cele ale giberelinei. Acidul abscisic (fig. 24) a fost izolat și purificat, în anul 1961, de *Liu* și *Carns*, din capsule imature de bumbac. El a fost numit inițial abscizină, deoarece aplicat pe locul rămas după îndepărtarea limbului frunzelor de bumbac a provocat căderea peţiolurilor. *Eagles* și *Wareing* (1963) au izolat din frunze de mesteacăn un inhibitor pe care l-au numit "dormină", compus ce inhiba dezvoltarea mugurilor. Tot în anul 1963, *Obkuma* și colaboratorii au izolat și purificat o substanță (din capsulele tinere de bumbac) care aplicată la nivelul frunzelor grăbea abscizia acestora. Ulterior, *Milborrow* (1966) a identificat substanța abscisină la numeroase plante, aceasta fiind botezată *acid abscisic*. În anul 1967, la cea de a VI-a Conferință internațională referitoare la substanțele de creștere, de la Ottawa, s-a stabilit că acidul abscisic este un fitohormon de natură sescviterpenică, cu 15 atomi de carbon. Forma conjugată de abscisil-β-D-glucopiranozid (cea mai frecvent întâlnită în plante) este inactivă; la nevoie, prin hidroliză, celulele pot pune în libertate AAB. Căile de *biogeneză* ale AAB și ale giberelinelor, până la punctul formării farnesilpirofosfatului, sunt comune, prin intermediul enzimelor cele două căi se despart, dând naștere, separat, la cele două tipuri de fitohormoni. În laborator, *Milborrow* (1974) a realizat sinteza AAB din acid mevalonic, în prezența unui echipament enzimatic derivat din cloroplaști izolați; o altă cale posibilă de sinteză a acestuia, ar fi plecând de la violaxantină. Biosinteza AAB este localizată în frunze (în toate etapele lor de dezvoltare), iar circulația înspre celelalte părți ale plantei se face prin floem. În culturile de țesuturi și celule vegetale AAB este utilizat într-o mică măsură. În unele tipuri de culturi, de exemplu în embriogeneza somatică, prezența AAB induce intrarea embrionilor în repaus; în unele cazuri, aportul de AAB la mediile de cultură ajută la o mai bună conservare a vitroculturilor (*Taiz* și *Zeiger*, 1991).

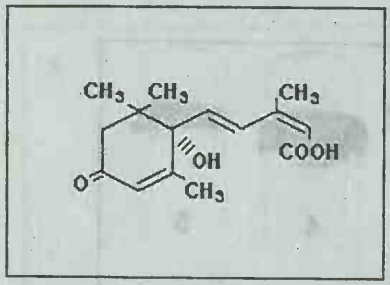


Fig. 24. Formula acidului abscisic (AAB)

3.4.1.2.5. *Compușii fenolici*

Compușii fenolici din celulele plantelor acționează antagonic substanțelor de creștere, inhibând unele reacții metabolice, oprind creșterea și intervenind, pe lângă AAB, în producerea fenomenelor de latență, dar și în intrarea celulelor în senescență și în necroză.

În cazul explantelor cultivate *in vitro*, mai ales la speciile lemnoase, compuşi fenolici sunt eliminaţi în mediile de cultură, dar nu numai de către celulele traumatizate, ci, uneori, şi de celulele din profunzimea inoculilor. Fenolii, treptat, se oxidează, fenomen care are ca o primă consecinţă brunificarea mediilor de cultură. Aceştia fiind toxici, celulele aflate în cultură – la scurt timp după eliberarea lor în mediu – situate în imediata apropiere a acestora, se necrozează, ei constituindu-se în bariere ce se interpun între inocul şi mediu, suprimând – la acel nivel – schimburile dintre celulele vii şi substratul de cultură, proces care provoacă, în final, moartea inoculilor. Pentru preîntâmpinarea acţiunii profund nocive a fenolilor oxidaţi, la astfel de culturi se indică operarea a 2-3 subculturi succesive, efectuate pe medii proaspete practicate în cascadă, executate la intervale de zile sau săptămâni (în funcţie de specie), prealabil reinoculării îndepărtându-se ţesuturile necrozate (brunificate). După *Gupta* şi colaboratorii (1981) (din *Bhojwani* şi *Razdan*, 1983), în cazul mugurilor din care vor fi prelevate explante meristematice sau apexuri, prealabil inoculării finale, este salutară măsura de cultivare a acestora pe medii de cultură lichide, timp de trei zile, la temperatura de 15^{0}C, în lumină continuă, cu intensitatea de 500 lucşi şi apoi, pe un mediu solid. În urma unui astfel de demers, s-a reuşit prevenirea necrozelor – la explante de *Eucalyptus citriodora* – recoltate de la exemplare de arbori cu o vechime de 20 de ani. Dacă brunificarea mediului persistă, la fiecare repicare se recomandă adăugarea în mediul de cultură a unor substanţe cu proprietăţi *antioxidante*, cum sunt: *cisteina* HCl (100 mg/l), *acidul ascorbic* (50 – 100 mg/l), *acidul citric* (150 mg/l), *ditiotreitolul* (DTT), şi altele. O altă cale de prevenire a acţiunii nocive a fenolilor oxidaţi este aceea a introducerii în mediul de cultură a unor compuşi care deţin proprietăţi adsorbante, cum ar fi *polivinilpirolidona* (Policar AT sau PVP). În unele situaţii (de exemplu la explantele de *Tectona grandis*), s-au obţinut rezultate mai bune cu PVP insolubil, în raport cu acelea înregistrate în cazul utilizării de PVP solubil. Adeseori, rezultate pozitive, în ceea ce priveşte supravieţuirea inoculilor, s-au obţinut şi prin introducerea în substratul de cultură, ca adsorbant, a cărbunelui activ. Uneori, păstrarea la întuneric – pentru o perioadă de timp, a explantelor inoculate – a condus la o micşorare a proceselor de oxidare a fenolilor, înregistrându-se, în consecinţă, o mai slabă brunificare a mediului, preîntâmpinându-se astfel efectul nociv al acestora, asupra evoluţiei cormofitoinoculilor (după *Bhojwani* şi *Razdan*, 1983).

Într-o categorie specială se încadrează compuşii *fenolici* care pot interveni favorabil asupra nivelului endogen de auxină (acizii: *clorogenic*,

cafeic, *ferulic* etc.), blocând AIA – oxidază sau, dimpotrivă, inhibând formarea antiauxinelor native (*acizii p-hidroxibenzoic*, *p-cumaric*, *vanilic* etc.).

Un compus organic cu rezultate benefice asupra evoluției explantelor prelevate de la specii silvice este *floroglucinolul*, compus fenolic, izolat din seva brută a merilor. Acest compus este frecvent utilizat în culturile de explante care provin de la pomi fructiferi, cu precădere de la specii din familia *Rozaceae*. *Jones* și colaboratorii (1976, 1979) recomandau adaosul de floroglucinol pentru asigurarea unei mai bogate multiplicări a tulpinițelor și o mai corespunzătoare înrădăcinare a vitroplantulelor neoformate pe medii aseptice, efect confirmat și de către *McComb* (1978). Dar, după afirmațiile lui *Quoirin* și colaboratorii (1977), *Zimmerman* (1978) a găsit floroglucinolul ca fiind un compus lipsit de efect, sau ca având o acțiune inhibitoare asupra caulogenezei.

3.4.1.2.6. *Alte substanțe cu efecte în reglarea creșterii vitroculturilor vegetale*

În afara regulatorilor de creștere, în unele rețete de medii de cultură se recomandă adăugarea unor substanțe ale căror mecanisme de acțiune fie nu sunt cunoscute, fie se acceptă producerea de către ele a unor influențe benefice, asemănătoare fitohormonilor, sinergic auxinelor ori citochininelor. Astfel de substanțe sunt: *picloramul*, *insatinul*, unele *carburi* cancerigene (cum sunt: *antracenul*, *metilcolantrenul* și *acidul traumatic*), *agenții chelatizanți* (*acidul 1,3 diamino 2 hidroxipropan N, N, N tetraacetic*), *erbicidele* (*benazolinul*), *antibioticele* etc. În unele rețete de medii de cultură, în scopul intensificării proceselor de morfogeneză, este indicată adăugarea *sulfatului de adenină*, a *difenilureei* sau chiar a *ureei*, compuși cu acțiune citochininică.

Există numeroși alți compuși cu efecte fitoregulatoare. *Gaspar* aprecia, în anul 1994, că se cunosc mai mult de 400 noi substanțe – naturale sau de sinteză – ale căror activitate bioactivă este manifestă la concentrații de sub 10μM. Astfel, *poliamidele* pot influența diviziunea și creșterea în lungime a celulelor, asemănător auxinelor, dar ele nu stimulează rizogeneza. În schimb, *sterolii* stimulează rizogeneză, în prezența auxinei (*Buchala* și *Schmid*, 1979) (din *Boxus* și colab.1995), fapt semnalat și de *Cachiță* și colab., 1997, iar *salicilații* au rol activ în germinație, înflorire, în rezistența plantelor la boli și în procesele de tuberizare. *Jasmoniții*, derivați ai acidului jasmonic, exercită efecte multiple asupra plantelor și au rol activ în tuberizare și în formarea bulbilor. După *George* și *Sherrington* (1984) acidul 2,3,5-tri-iodobenzoic (ATIB sau TIBA) inhibând deplasarea polarizată,

bazipetală, a auxinei, poate fi utilizat pentru stimularea caulogenezei în explantele prea bogate în auxin nativă

Atât în cazul auxinelor, cât şi în cel al citochininelor, formele conjugate de auxine şi de citochinine se găsesc în cantităţi mai mari în corpul plantelor, în raport cu fitohormonii liberi; în principal rolul acestora este acela de a echilibra nivelul fitohormonal endocelular, sub influenţa tratamentelor externe efectuate cu regulatori de creştere (după *Boxus* şi colab., 1995).

Procaina sau novocaina (clorhidratul de para-aminobenzoat de dietilaminoetanol), este un compus cu acţiune stimulatoare asupra creşterii plantelor, şi a inoculilor aflaţi în vitrocultură (vezi *Cachiţă*, 1987 şi *Cachiţă şi Ardelean*, 1996), concentraţiile active fiind de 1-10 mg/l; efectele procainei constau, în principal, în amplificarea înmulţirii celulelor, a creşterii în lungime şi în substanţă uscată, a conţinutului în clorofilă, a absorbţiei, respiraţiei ş.a.m.d., atât la plantele superioare, cât şi la microorganisme. În vitrocultură s-au obţinut rezultate de excepţie în multiplicarea protocormilor de *Cymbidium* şi în creşterea calusului de morcov şi de *Arabidopsis*.

Amestecuri complexe şi extracte vegetale

Începând cu primele experimente, efectuate în epoca de pionierat, în mediile de cultură au fost adăugate o serie de extracte, cum ar fi: extract de *drojdie de bere*, *hidrolizat de cazeină*, *suc de portocale*, *suc de tomate*, *lapte din nucă de cocos*, *extract de malţ*, *extract din endosperm imatur de porumb* etc. De regulă, astfel de extracte sunt utilizate în concentraţii scăzute (de 0,1 – 1 g/l), tatonându-se – în prealabil – efectele lor, în doze crescânde, în funcţie de tipul de inocul şi de cel de cultură. Compoziţia chimică a acestora este complexă şi nu este pe deplin cunoscută. Este posibil ca efectul lor, în impulsionarea proceselor de organogeneză sau de embriogeneză, să fie datorat aportului, prin ele, în mediul de cultură, de fitohormoni, vitamine, aminoacizi esenţiali şi de compuşi de tipul elementelor chimice legate în complexe organometalice, mai uşor accesibile celulelor.

3.4.1.2.7. *Agenţii gelificanţi*

Frecvent, culturile *in vitro* se practică pe medii gelificate. Pentru aceasta, mediilor nutritive lichide li se adaugă un *agent gelificant*. Într-un mediu gelozat însă, în general, migrarea substanţelor, a ionilor şi a gazelor este mult îngreunată, lentoarea circulaţiei fiind dependentă de gradul de hidratare al mediului, de greutatea moleculară a substanţelor, de diametrul

porilor formați în substrat, şi de concentrația agentului gelificant (respectiv de compactitatea micelelor existente în mediul de cultură gelificat).

Până în prezent, agar-agarul este agentul cel mai utilizat pentru gelificarea mediilor de cultură recomandate pentru cultivarea *in vitro* a explantelor vegetale. Agarul este un polizaharid extras din algele roşii şi este comercializat sub formă de fibre, solzi sau de pulbere. Agarul de cea mai bună calitate este acela de uz bacteriologic, comercializat sub denumirea de Difco Nobel Bacto-Agar. Celelalte tipuri de agar prezintă un grad mai scăzut de puritate, ele se lichefiază mai lent, şi prin adaosul de agar în mediul de cultură se introduce în acesta o serie de ioni, care pot afecta echilibrul ionic şi compoziția substratului de cultură (vezi tabelul 10). În cazul în care nu se dispune de Bacto-Agar, acesta se poate substitui cu agar solzi. Agar-agarul fibre, cel mai puțin pur agar, obligatoriu, după cântărire, prealabil utilizării lui, trebuie înmuiat şi spălat – de repetate ori – cu apă bidistilată. În vitroproducție, se poate utiliza şi un agar cu un grad mai scăzut de puritate. Cantitatea de agar, recomandată pentru a fi adăugată mediului de cultură, diferă de la un autor la altul, în funcție şi de natura culturilor şi tipul inoculilor, ea variind între 0,6 – 1% (după *Street*, 1977). De curând, au fost introduse – ca agent gelificant – cu excelente rezultate, agregatele microcristaline de celuloză (AMC).

În condițiile utilizării ca agent gelificant a gelatinei, în concentrație de cca. 10%, creşterea țesuturilor vegetale este frânată. Diminuarea creşterii explantelor, pe substrat solidificat cu gelatină se produce, în primul rând, din cauza compactității gelului realizat şi a unei insuficiente aerări a țesuturilor, a îngreunării schimburilor ionice, respectiv a frânării absorbției elementelor şi a substanțelor din substratul de cultură (după *Gautheret*, 1959).

În gelificarea mediilor de cultură, optime cultivării *in vitro* a explantelor cormofitice, cu rezultate bune sunt folosite şi *biogelurile, silicagelul* sau gelurile de *poliacrilamidă*, prețul lor de cost situându-se însă mult peste cel al agarului.

3.4.1.2.8. *Compuşii speciali*

În unele tehnici de culturi de celule, ori în cele de culturi de protoplaşti, sunt folosite – pentru o anumită perioadă de timp – o serie de *enzime* (*celulază*, *pectinază*, *hemicelulază*), sau alți compuşi, cu o utilizare mai de durată, ca stabilizatorii osmotici, cum sunt: *sorbitolul*, *manitolul*, *polietilenglicolul* (PEG). Enzimele sunt introduse în mediile de cultură doar pentru a

realiza macerarea, respectiv liza pereților celulari pectocelulozici, în scopul denudării celulelor și a eliberării protoplaștilor în mediul de cultură.

Compuși antivirali

Utilizarea de substanțe cu efecte *antivirale* (*viricide*), ca adaosuri la mediile de cultură destinate obținerii de vitroculturi libere de viroze, s-a dovedit a fi o procedură foarte puțin folosită în practica curentă (după *Boxus* și colab., 1995). Unele tratamente chimioterapeutice, la plante, au fost făcute cu antimetaboliți de tipul *ribavirinei* (*virazolului*), care a fost eficientă în unele cazuri, compusul ne fiind un protector al celulelor împotriva infecției virale, ci un inhibitor al unor procese metabolice ce determină o blocare a translocării particulelor virale (după *Toussaint*, 1985). Sterilizată prin filtrare, ribavirina este utilizată în concentrație de 35 ppm. Întrucât ea prezintă un anumit grad de fitotoxicitate nu se recomandă utilizarea acesteia în mai mult de două subculturi. Folosită ca adaos în mediile de cultură, la 90% dintre plantulele de *Cymbidium*, a fost sistată infecția virală și nu a mai fost observată nici o recidivă, timp de cinci ani (*Toussaint* și colab., 1993). Compusul s-a dovedit eficient și în eliminarea virusului CLSV la măr (*Hansen* și *Green*, 1983) și la prun (*Deogratias*, 1987). Un alt compus cu efecte antivirale este 2,4-dioxohexahydro – 1,2,5-triazina (DHT) împotriva virusului NRSV, dar care s-a dovedit lipsit de acțiune viricidă la prun contra virusurilor CLSV și PDV (*Deogratias*,1987). Din cele arătate, se poate conclude că eficacitatea tratamentelor antivirale este dependentă de tipul de virus și de specia virusată, după *Boxus* și colaboratorii (1995) reacția înregistrată, în vitrocultură, depinzând chiar și de cultivar.

Cărbunele activ (cărbunele de lemn)

Pulberea de *cărbune activ* se recomandă să fie adăugată mediilor de cultură destinate vitrotehnicilor vegetale, atunci când se urmărește adsorbția temporară, din acestea, a unor compuși, mai ales a celor cu rol regulator în creșterea *in vitro* a explantelor de conifere. Concentrația de cărbune activ, îndeobște utilizată, este aceea de 2 % (după *David* și colab., 1979). În alte cazuri, dezvoltarea mugurașilor la pinul maritim are loc, în condiții mai bune, pe un mediu lipsit de regulatori de creștere, dar cu adaos de cărbune activ. *Boulay* (1979) preciza că – la apexurile de *Sequoia* – cărbunele activ (2%) joacă un rol hotărâtor în procesul de alungire al mugurilor inoculați pe medii aseptice.

După *Margara* (1982), la unele specii, prezența în mediile de bază a cărbunelui activ favorizează creșterea țesuturilor, în culturile de apex sau de antere. *Weathered* și colaboratorii (1978) (citați de *Margara*, 1982) au constatat că pulberea de cărbune activ are capacitatea de a adsorbi 5-*hidroximetilfurfurolul* (compus care inhibă creșterea țesuturilor), format în mediile de cultură în urma degradării zaharozei prin caramelizare, în decursul supraautoclavării acestora. Totodată, cărbunele activ adsoarbe auxinele, citochininele, compușii fenolici și taninurile (care, mai ales la speciile lemnoase, sunt incriminați ca fiind cauza necrozării țesuturilor inoculate pe medii aseptice) existente în mediile în care acesta este prezent.

3.4.1.3. Recomandări generale

În general, în alegerea și prepararea mediilor de cultură vor fi respectate indicațiile date în literatura de specialitate. Se va acorda o atenție, cu totul deosebită, *reglării valorii pH-ului mediului*, prealabil autoclavării, la valoarea recomandată în bibliografia de specialitate. Reglarea pH-ului se va face adăugând – picătură cu picătură – soluții diluate de acizi (HCl sau de acizi organici), ori de baze (NaOH sau KOH), în concentrații normale sau de 0,1N. Valorile cele mai obișnuite de pH, în cazul mediilor de cultură destinate creșterii *in vitro* a țesuturilor și celulelor vegetale, sunt cuprinse între 5,6 și 5,8. În unele cazuri (de exemplu la orhidee), se practică coborârea pH-ului mediului de cultură cu suc de citrice, până la valoarea de 5.

Mediul de cultură care conține macroelemente, microelemente, Fe-EDTA și compuși organici (un glucid, mezo-inozitol și vitamine) constituie mediul de bază (MB), cu referire exactă la autorul al cărui rețetă de mediu o utilizăm în experimente; totodată se vor face referiri exacte dacă mediul este gelificat, și cu ce anume. În prezentarea rezultatelor experimentale, de fiecare dată, se va nota și se va specifica oricare modificare operată în compoziția mediului de bază, precum și balanța hormonală utilizată, respectiv natura regulatorilor de creștere și concentrația acestora.

Mediile, odată preparate, trebuie imediat sterilizate. În caz contrar, glucidul din ele fermentează și mediile se degradează repede, schimbându-și calitatea și valoarea pH-ului.

În lucrarea monografică "*Plant culture media*", editată între anii 1987-1988 de *George* și colaboratorii, pot fi găsite compozițiile tuturor mediilor de cultură, publicate în domeniul vitroculturilor vegetale, de către diferiții autori, până în anul 1987.

3.5. CORMOFITOINOCULII – PARAMETRI TEHNICI ŞI BIOLOGICI. PRINCIPII DE BAZĂ

3.5.1. Consideraţii generale

La cormofite, practicile de vitrocultură sunt variate, dar ele deţin şi numeroase *elemente comune* (vezi schemele din fig. 25 şi 26), unele dintre acestea fiind caracteristice oricăror tipuri de culturi *in vitro*, cum ar fi fazele *premergătoare* inoculării: utilizarea de *medii* de cultură *artificiale*, *axenice*, *asepsizarea instrumentarului* şi a *recipientelor* de cultură (înainte şi după porţionarea mediilor, în cazul în care acestea nu au fost sterilizate în prealabil, prin variate proceduri), dar şi a faptului că inoculările se fac în *incinta sterilă*, cu respectarea unor *reguli* severe de *asepsie*, operarea cu un *material biologic lipsit de germeni*, *selectarea* şi pregătirea inoculilor, *incubarea* culturilor după *inoculare*, *trierea* lor la câteva zile de la inoculare şi îndepărtarea culturilor infectate sau necrozate, *creşterea* vitroculturilor în camere sau în incinte special amenajate, ori în fitoreactoare sau în fermentatoare, sub regim ecofiziologic strict reglat şi controlat şi, în final, *desfiinţarea* culturilor, moment în care se procedează fie la *transferarea* acestora (a culturii *primare* sau a celor aflate în diferite trepte de *subcultură*) pe medii proaspete (de o aceeaşi compoziţie sau de compoziţie diferită), fie la *aclimatizarea* vitroplantulelor la condiţiile de viaţă *ex vitro*, fie la *stocarea* sau *conservarea* – de scurtă sau lungă durată – a vitroculturilor, ori la *valorificarea biomasei*, fază în care predominante sunt aspectele comerciale şi economice. În momentul desfiinţării culturilor, materialul vegetal generat *in vitro* poate fi *analizat* din variate puncte de vedere (gravimetric, chimic, biochimic, fiziologic, morfoanatomic, microscopic – microscopie optică sau electronică – etc.).

În dependenţă de *tipul* de cultură (de: *calus*, *meristeme*, *rădăcini*, celule, protoplaşti etc.), de *natura*, *mărimea* şi *numărul* inoculilor per recipient (respectiv de capacitatea vaselor de cultură), se aleg: *compoziţia* şi *specificul mediilor* de *cultură*: *solide*, *semisolide*, *lichide* (aerate prin agitare, balansare, rostogolire sau prin barbotare, ori prin perfuzarea coloanelor cu celule imobilizate pe suporturi inerte, sau susţinerea inoculilor prin utilizarea de fitile, cartuşe, lignoscheleton, fibre poliuretanice, vată de sticlă etc.), *recipientele* (eprubete, flacoane variate ca formă şi mărime, vase etajate, fitoreactoare – sferice sau cilindrice etc.), şi *regimul* de cultură (temperatură, alternanţă sau nu a luminii cu întunericul, fotoperioadă, culturi

SCHEMA
cu
FAZELE OPERAȚIONALE SPECIFICE DIFERITELOR ETAPE DE VITROCULTURĂ

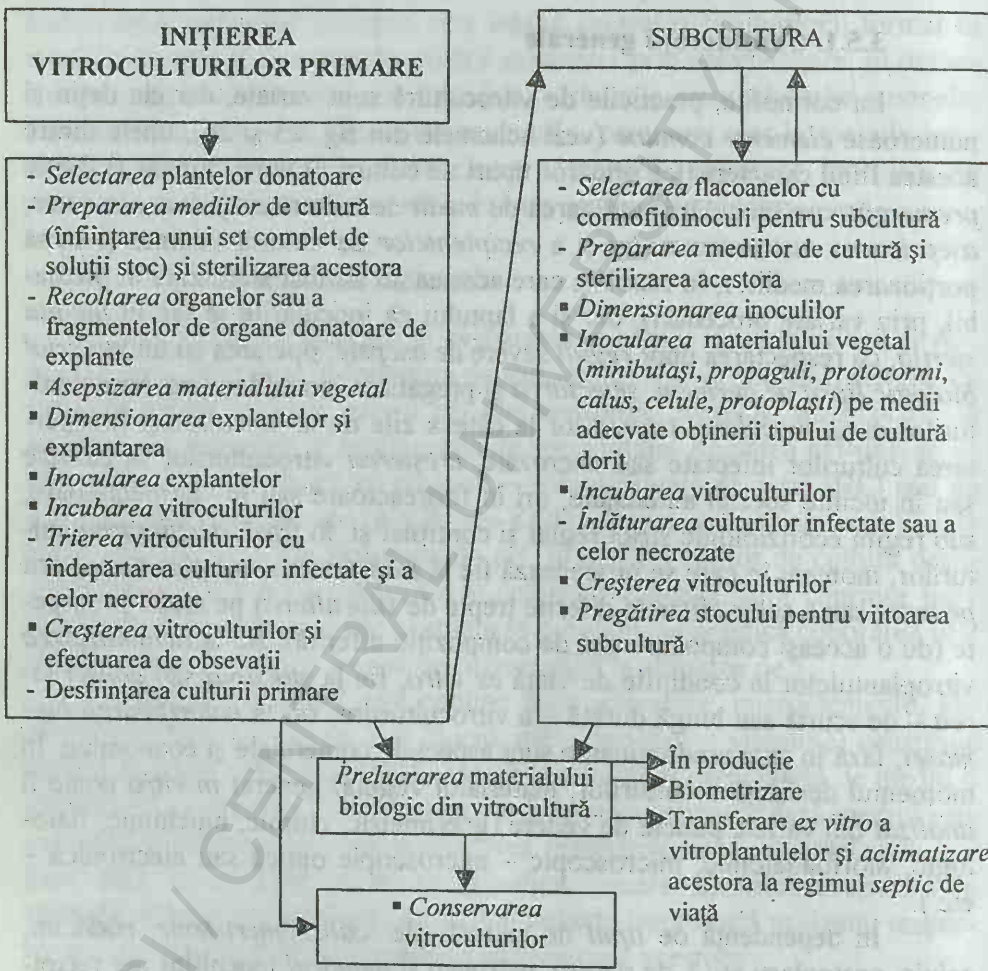


Fig. 25. Elemente comune în practicile de vitroculturi vegetale

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

SCHEMA
CU PRINCIPALELE OPERAȚIUNI ÎN ETAPELE DE

MICROPROPAGARE CLONALĂ

PREVITROCULTURĂ

- *Selectarea* plantelor mame donatoare de explante
- *Înființarea unei culturi de plante mame*, în spații protejate și întreținerea acestora
- *Analizarea* plantelor mame din punct de vedere *fitopatologic*
- *Termoterapia* dacă este necesară
- *Plantarea* în vase speciale adecvate aplicării tratamentului de termoterapie a unui lot de plante mame destinate termoterapiei; după intrarea culturilor în regim normal se va proceda la introducerea ghivecelor cu plante mame în camerele de termoterapie
- *Prepararea mediilor* de cultură și sterilizarea acestora
- *Recoltarea vârfurilor* de tulpini și dezinfectarea acestora
- *Dimensionarea* și *prelevarea* de expante, (de regulă meristematice - în regim *aseptic* - din vârfurile și de la axila frunzelor tulpinilor, la stereomicroscop

ÎNFIINȚAREA VITROCULTURII

- *Inocularea* explantelor
- *Incubarea* vitroculturilor în camerele de vegetație
- *Trierea* culturilor prin înlăturarea recipientelor infectate și necrozate
- *Creșterea* vitroculturilor
- *Testarea* virusologică a culturilor
- *Trierea* vitroculturilor, cu înlăturarea culturilor infectate viral și păstrarea vitroculturilor "libere de viroze"
- *Vitroplantulele*, generate din inoculii inițiali, pot urma variate căi:
  - *vitrostocarea* culturilor, la tempertaturi coborâte, pozitive 5-7^{0}C sau prin alte procedee
  - confecționarea de minibutași, ori dimensionarea propagulilor pentru *subcultură* și *micropropagare*
  - *înrădăcinarea in vitro* a propagulilor sau a lăstarilor
  - *înrădăcinare ex vitro* a propagulilor sau a lăstarilor
  - *transferarea ex vitro* a vitroplantulelor sau a propagulilor înrădăcinați pentru *aclimatizare*
- Postaclimatizare, înființarea unei culturi de plante superelită "libere de viroze" ca donatoare de butași pentru înmulțire vegetativă, prin metode convenționale

SUBCULTURA pentru MICROPROPAGARE

- Etapele operaționale sunt asemănătoare cu cele din schema din fig. 25

ACLIMATIZAREA

- Atât din vitrocultura primară, dar mai ales din vitrosubcultură rezultă *plantule* sau *propaguli* înrădăcinați ce trebuie aclimatizați la viața în mediul septic.
- Lăstarii sau propagulii lipsiți de rizogeneză, uneori, pot fi înrădăcinați în decursul fazei de aclimatizare.

ÎNFIINȚAREA UNEI PLANTAȚII SUPERELITĂ, ÎN SERE

- operațiuni efectuate în regim *septic*
- operațiuni executate în regim *aseptic*

Fig. 26. Operațiuni comune în procedurile de micropropagare practicate *in vitro*

pe substrat ori în regim submers – staționare ori în mediu agitat – sau în dublu strat, ş.a.m.d.); există şi *particularități* tehnice, sau cerințe care presupun amenajări şi dotări speciale, ori chiar de excepție, aşa cum se pretind în cazul *fitoreactoarelor*, mai ales a acelora implicate în industriile care valorifică biomasa rezultată din vitrocultură. La cele arătate, pot fi menționate şi situațiile în care totalitatea procedurilor, sau numai a unor trepte operaționale din etapele de vitrocultură, sunt *robotizate*, particularități care vizează nu numai o dotare de profil, dar şi o pregătire profesională, de specialitate, de excepție, a personalului, corespunzătoare – ca şi competență tehnică – utilizării unor astfel de instalații.

În consecință, operațiunile şi tehnicile din unitățile profilate pe vitrocultură pot să fie *simple* sau *complexe*, manuale, semiautomate, mecanizate sau robotizate, procedurile referindu-se fie la etapele premergătoare şi pregătitoare ale fazelor operaționale din vitrocultura propriu-zisă (cum sunt cele de lavare a sticlăriei, de porționare a mediilor în recipientele de cultură etc.), fie, altele – cum este cazul robotizării – care privesc întregul flux thenologic, mai ales în micropropagare, inclusiv parcurgerea fazei de aclimatizare.

Etapele care trebuie parcurse în cazul culturilor *in vitro*, la cormofite, depind de *scopul* urmărit, de *materialul biologic* donator de viitori inoculi, de *calitățile morfofiziologice* ale acestuia, *tipul culturilor* pe care avem în vedere să le obținem, dacă este vorba de o cultură primară sau de o subcultură, efectuarea de cercetări ştiințifice sau de activități productive, de anvergură industrială etc. Obiectivul urmărit poate fi variat, de exemplu: clonarea rapidă a unor genotipuri din natură sau a celor stocate în camerele de conservare (libere de viroze), producerea de culturi de calus (compact sau friabil), de celule (libere sau imobilizate), ori de protoplaşti, sau urmărirea unui curs invers, respectiv trecerea de la culturi de protoplaşti la obținerea de culturi de celule, iar, de la acestea, la regenerarea de calus, cu sau fără generare de plante etc., fiecare tip de cultură însemnând practicarea unui *protocol operațional* specific, care impune parcurgerea unor etape de lucru, *caracteristice*. De exemplu, tehnicile de *micropropagare in vitro* se disting de alte categorii de vitroculturi vegetale, printr-o serie de etape procedurale care sunt particulare acestui tip de biotehnologie vegetală, de profil industrial, care-şi are operațiunile sale specifice: termoterapie, teste de confirmare a calităților fitosanitare şi genetice ale materialului de plantat, aclimatizarea, butăşirea şi înrădăcinarea *ex vitro* a acestora etc. Altele, cum sunt bioindustriile, vizează obținerea şi prelucrarea biomasei generate *in vitro*, în timp ce băncile de gene au ca obiectiv conservarea cormofitoinoculilor, ş.a.m.d.

Unitățile care operează cu inoculi cormofitici pot fi, în marea lor majoritate, laboratoare de uz *didactic*, sau laboratoare de *cercetare*, fie sunt unități *manufacturiale*, de mai mică ori de mai mare capacitate. Doar marile unități industriale pot să-şi permită mecanizarea sau robotizarea procedurilor de vitrocultură.

În oricare unitate, în vitrocultură se urmăreşte un desfăşurător strict al principalelor operațiuni. În funcție de elementele de noutate intervenite în raport cu programul obişnuit, cunoscut (respectiv dacă sunt culturi de rutină, sau dacă se pune problema inițierii unui nou tip de vitrocultură, ori introducerea în cultură a unei noi specii sau varietăți, ori a unui nou model de explant, ş.a.m.d.), poate deveni necesară efectuarea unor *tatonări*, cu privire la alegerea naturii materialului vegetal, în funcție de specificul unei noi culturi (cultură executată pe medii agarizate, sau solidificate cu biogeluri, ori efectuarea de culturi lichide etc.).

În laboratoarele demonstrative şi în cele de cercetare sunt urmărite fenomenele morfofiziologice, de organogeneză sau de embriogeneză, ori cele legate de menținerea celulelor aflate în vitrocultură, într-o stare nediferențiată (de exemplu de calus sau de celule solitare), mai ales atunci când se are în vedere producerea de biomasă, dar şi aspectele care privesc dinamica creşterii culturilor (cu efectuarea de biometrizări privind dimensiunea şi numărul organelor, sau de gravimetrie), ori observații microscopice, referitoare la structurile tisulare, sau la organizarea celulară, ori la densitatea celulelor aflate în cultură, viabilitatea acestora etc., sau determinări biochimice variate, studii de biologie moleculară ori de inginerie genetică ş.a.m.d. Alte studii privesc analizarea aspectelor referitoare la urmărirea comportamentului cormofitoinoculilor în *subcultură*, sau a vitroplantulelor ori a propagulilor în decursul *aclimatizării* lor *ex vitro* etc.

În cazul unităților de producție, un rol preponderent îl au operațiunile de *subcultivare*, care sunt practicate la intervale regulate de timp, şi care utilizează fie minibutaşi, propaguli, protocormi, în micropropagare, caracterizați din punct de vedere genetic, calitativ şi productiv, ce provin dintr-o vitrocultură preexistentă în laborator, sau care a fost obținută dintr-o colecție, de la o unitate specializată pe acest profil, fie în unitățile în care suspensiile celulare sunt folosite ca material inițial, liniile celulare – utilizate pentru inoculările curente, practicate în fluxul productiv – sunt rezultate dintr-o prealabilă selectare a tulpinilor după calitățile dovedite de ele în regim de vitrocultură, celule care vor fi clonate, prin multiplicare în laboratorul de specialitate, profilat pe întreținerea, clonarea şi conservarea acestora, fără riscul alterării calităților lor, în primul rând a celor de natură biochimică.

Procedurile de micropropagare, la cormofitoinoculi, constau în parcurgerea unor etape de lucru mai simple decât cele utilizate în fazele operaționale specifice momentului de *înființare* a unei culturi primare, întrucât, în *subcultură*, de regulă, nu se mai trece prin etapa de tatonare, ori prin faza de asepsizare a materialului vegetal, deoarece aceste cerințe – de cele mai multe ori – au fost deja satisfăcute, în vitromultiplicare efectuându-se doar operațiuni standard de porționare a materialului biologic aflat în vitrocultură (la unele explante, eventual, executându-se o toaletare a acestora, îndepărtându-se zonele necrozate sau senescente), în: minibutaşi, propaguli, protocormi, ori – după caz – în fragmente de țesut calusal, sau – la culturile celulare – în aspirarea unei anumite cantități din suspensia de celule şi inocularea acesteia pe medii aseptice, proaspete, adecvate ca şi compoziție chimică scopului urmărit şi tipului de cultură dorit. În această etapă, dacă se lucrează corect, riscurile apariției de infecții sunt minime.

3.5.2. Selectarea materialului vegetal pentru vitrocultură

3.5.2.1. Criterii urmărite în momentul *înființării* unei vitroculturi aseptice primare sau a *inițierii* unui alt tip de cultură *in vitro*

Vitroculturile, pot fi categorisite nu numai după specificul acestora, ori a naturii materialului biologic conținut în mediile de cultură, ci şi după *treptele* operaționale parcurse în realizarea lor. Astfel, se poate vorbi despre *înființarea* unei vitroculturi, atunci când aceasta a luat naştere dintr-un material biologic ce provine dintr-un *mediul septic*. Într-o asemenea situație, etapele operaționale sunt mai complexe. Dacă dintr-o vitrocultură preexistentă se procedează, prin *subcultură*, la obținerea unui *alt tip* de vitrocultură, cu un alt specific, avem de-a face cu *inițierea* unei vitroculturi, cum ar fi, de exemplu, *inițierea* unei culturi de celule dintr-o cultură de calus, sau a unei culturi de embrioni somatici dintr-o suspensie de celule, ori a unei culturi de calus dintr-o suspensie de celule, ori a unei culturi de celule dintr-o cultură de protoplaşti etc.

Înainte de demararea unei operațiuni de vitrocultură, trebuie să ne informăm cu privire la toate aspectele referitoare la *selectarea* materialului vegetal destinat vitroculturii, nu numai în ceea ce priveşte caracterele şi *caracteristicile* botanice, morfofiziologice şi biochimice, ce țin de specie, eventual de genotip (mai ales în cazul vitrotehnicilor prin care se urmăreşte obținerea unor produşi secundari de metabolism), ci şi cu privire la *proveniența* materialului biologic (din cadru natural sau protejat, ori dintr-o vitrocultură, dacă sunt culturi normale sau conservate, şi cum anume,

ş.a.m.d.), din care organe sau ţesuturi ale plantei derivă acesta, în care *sezon* au fost făcute recoltările etc.

Totalitatea măsurilor şi a operaţiunilor care sunt efectuate prealabil momentului înfiinţării unei vitroculturi fac parte din aşa numitul *stadiu zero*, *pregătitor*, ce precede demararea lucrărilor propriu-zise, care se cer executate în regim de vitrocultură. În acest stadiu zero, după o bună cunoaştere a cerinţelor materialului vegetal cu care se va lucra, în funcţie de *faza ontognetică* în care se află acesta, se procedează la *asepsizarea* lui şi la *explantarea* viitorilor inoculi. După inocularea explantelor (una sau mai multe într-un recipient de cultură), se realizează *înfiinţarea*, respectiv *iniţierea* unei vitroculturi *primare*. *Dirijarea* evoluţiei culturilor de cormofitoinoculi, atât în cultura primară, cât şi în subcultură, va depinde de *specificul culturii*, *caracteristicile acesteia*, *scopul urmărit* (vezi schemele din fig. 25 şi 26), *natura compuşilor din mediul de cultură* (în special a regulatorilor de creştere) şi *condiţiile ecofiziologice* din camera de creştere, altfel spus, de regimul termic, hidric şi cel de iluminare.

În mod curent, vitroculturile primare rezultă din inocularea pe medii aseptice a unor explante derivate din plante, organe sau fragmente din acestea, crescute în condiţii septice, ceea ce presupune executarea unor proceduri de *sterilizare* ale materialului biologic.

O cultură primară de *calus* poate fi realizată atunci când aceasta este înfiinţată dintr-un inocul constând din ţesut calusal, proliferat în mod natural, din cauze diverse, la nivelul unor organe, fie el calus regenerativ, fie tumoral, sau calus generat în condiţii de vitrocultură, pe variate tipuri de explante. Culturile primare de *celule* pot fi obţinute numai printr-o macerare a ţesuturilor, respectiv o hidroliză cu pectinază a lamelei mijlocii (intercelulare) de pectat de calciu, caz întâlnit în experimentele care-şi propun ca temă de studiu analizarea evoluţiei unei astfel de vitroculturi. În practicile comune, o cultură de celule este iniţiată fie prin subcultură de calus, pe medii lichide, fie dintr-o cultură anterioară de celule, fie este derivată dintr-o cultură de protoplaşti. Deci, în cazul în care în obţinerea unei vitroculturi de alt tip se operează cu material biologic aseptic, derivat dintr-o altă vitrocultură, se vorbeşte despre *iniţierea* unui nou mod de cultură; dacă vitrocultura este de acelaşi tip cu cultura din care aceasta descinde, se consideră că procedura este doar o simplă subcultură, cu sau fără fragmentarea ori porţionarea materialului vegetal provenit din vitrocultura precedentă.

În funcţie de activitatea avută în vedere, *selectarea corectă a materialului biologic* reprezintă un factor decisiv, din punctul de vedere al *calităţilor naturale* pe care le deţin celulele viitorilor cormofitoinoculi, cu exten-

sia efectelor şi în subcultură, rolul jucat de aceşti factori endogeni influenţând evoluţia vitroculturilor, pentru o perioadă lungă de timp. Atunci când ne referim la *natura* şi *calitatea* materialul biologic, trebuie să avem în vedere nu numai apartenenţa *genetică* (gen, specie, varietate), ci şi componenta *morfoanatomică* a materialului biologic respectiv a organului, ţesuturilor şi a celulelor, ori latura *fiziologică* şi *metabolică*, *in vitro* înregistrându-se reacţii variate ale materialului biologic, în funcţie de stadiul de dezvoltare ontogenetică a materialului vegetal donator de explante, de proveniența cormofitoinoculilor, în momentul înfiinţării vitroculturilor, şi pe tot parcursul operaţiunilor de subcultură, factori care pot influenţa reuşita dirijării evoluţiei acestora, în direcţia dorită.

În figurile 27-30 sunt ilustrate aspecte referitoare la morfogeneză desfăşurată *in vitro*, la nivelul diferitelor tipuri de cormofitoinoculi. Astfel, după cum rezultă din figura 27A, la garoafe (*Dianthus*), pentru vitrocultură inoculul ideal este *meristemul* sau *apexul* caulinar (apexul având, la inoculare, dimensiunea de 1 mm, este cazul plantelor care au trecut prin tratamentul termic). Pe mediu cu 1 sau 0,1 mg/l auxină, contrabalansată cu 1 sau 0,1 mg/l citochinină (fig. 27A, poziţiile 5 şi 6), din *apexuri*, în regim optim de cultură, în decurs de 8-10 săptămâni (în funcţie de soi), vor lua naştere vitroplantule echilibrat conformate, care vor putea fi transferate *ex vitro* şi aclimatizate la viaţa în mediul septic. Explantele de tip apex, faţă de meristeme (ce au dimensiuni de circa 0,25 mm), vor manifesta o creştere mai rapidă, procentul lor de supravieţuire, în regim de vitrocultură, fiind maxim. Pe mediu cu 2,4-D 1 mg/l, apexurile vor genera calus; la nivelul calusului, dacă mediul va conţine şi BA 2 mg/l – o parte dintre primordiile apexului se vor transforma în muguraş (fig. 27B). Aceştia, detaşaţi şi subcultivaţi, vor genera vitroplantule. Dacă inoculul constă din *boboci*, de cca 3-4 mm, în regim de vitrocultură aceştia vor creşte; evoluţia lor morfogenă va depinde de soi, de rezervele endogene în fitohormoni şi de natura regulatorilor de creştere prezenţi în mediile de cultură. Atunci când bobocii de garoafe (fig. 27C-F) au fost inoculaţi pe mediu cu excedent de citochinine, în porţiunea lor bazală s-au regenerat numeroşi muguraşi (fig. 27C); dacă procesul de anteză a fost prea avansat, pe lângă formarea de muguraşi, bobocul a înflorit (fig. 27C şi D); în alte situaţii, dacă anteza nu a fost lansată, o parte din conţinutul bobocilor (petale, gineceu) s-a transformat în mai multe plantule (fig. 27D); dacă mediul a fost echilibrat constituit în ceea ce priveşte balanţa hormonală, din zona bazală a caliciului s-a regenerat o plantulă, lipsită de rădăcinişe (fig. 27E), iar când mediul a deţinut un excedent de auxine (alături de citochinine), în zona bazală a caliciului s-au

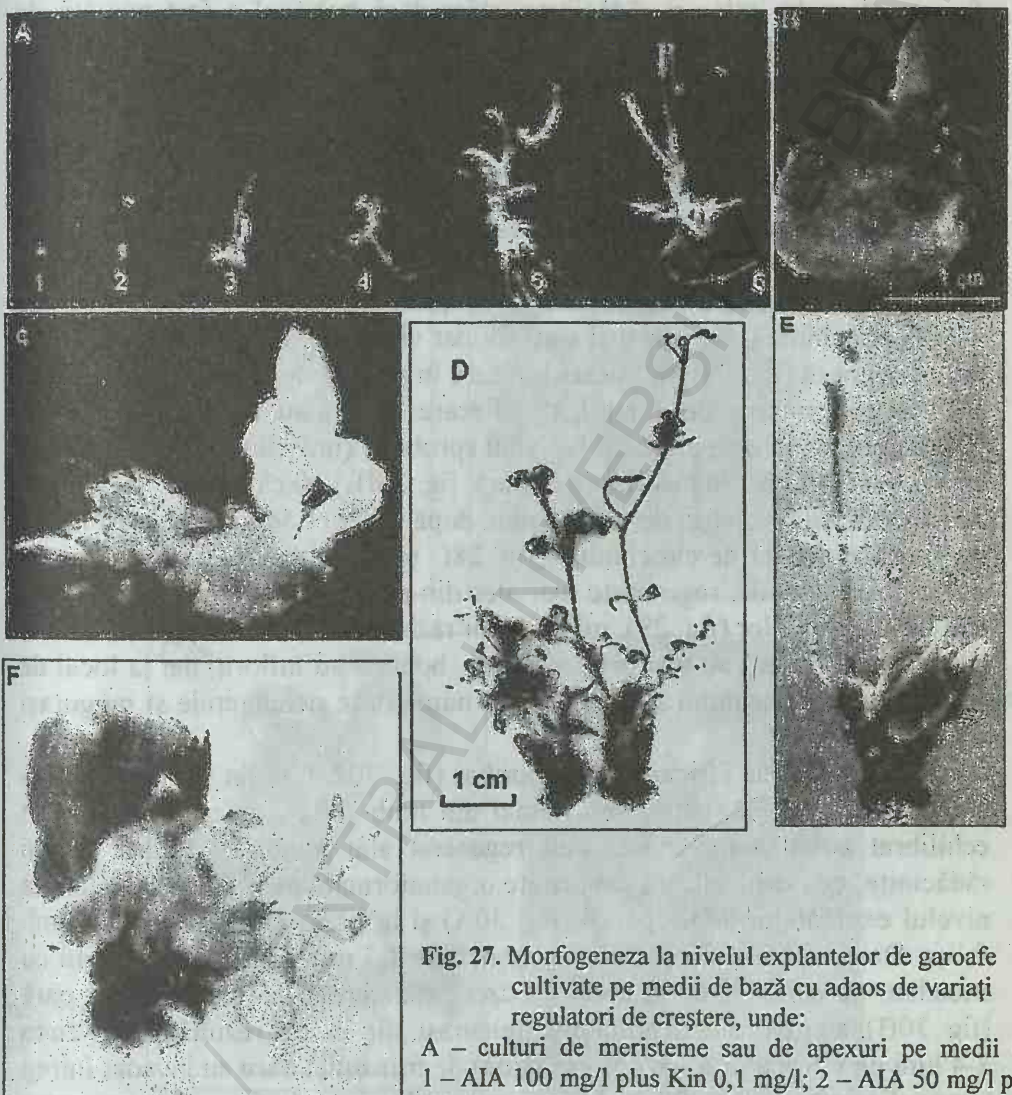


Fig. 27. Morfogeneza la nivelul explantelor de garoafe cultivate pe medii de bază cu adaos de variaţi regulatori de creştere, unde:
A – culturi de meristeme sau de apexuri pe medii cu 1 – AIA 100 mg/l plus Kin 0,1 mg/l; 2 – AIA 50 mg/l plu Kin 0,1 mg/l; 3 – AIA 20 mg/l plus 0,1 mg/l; 4 – 10 mg/ plus 0,1 mg/l; 5 – AIA 1 mg/l plus Kin 0,1 mg/l şi 6 AIA 0,1mg/l plus Kin 0,1 mg/l; B – inocul tip apex, pe mediu cu 2,4-D 1 mg/l generează *calus*; C-E – inoculi tip bobo cu procese, preponderent, de caulogeneză (C-E), dar şi cu caluso- şi rizogeneză (F) (*Cachiţă*, 1987)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

format plantule, calus și rădăcinițe, chiar dacă bobocul a fost pregătit de anteză (fig. 27 F).

La crizanteme (*Chrysanthemum*) (fig. 28A-D) explantele meristematice sau apexurile caulinare, în cca 10 săptămâni de la inoculare, au evoluat în vitroplantule (fig. 28A și B), cu talia de câțiva centimetri, ce pot fi transferate *ex vitro* și aclimatizate. Dacă apexurile au fost inoculate pe medii lipsite de regulatori de creștere acestea au generat, fiecare, câte o unică vitroplantulă, lipsită de rizogeneză sau cu rădăcinițe slab dezvoltate (fig. $28B_1$); dacă substratul de cultură a conținut un raport echilibrat 1/1 de auxină/citochinină, din apexuri s-au format vitroplantule robuste ce prezentau rizogeneză (fig. $28B_2$); în cazul în care în mediul de bază a existat numai BA, în concentrație de 2 mg/l, din fiecare apex s-au regenerat numeroși mugurași care au ocupat întreg lumenul eprubetei (unii dintre ei, din lipsă de spațiu, s-au afundat în mediul de cultură, fig. $28B_3$); dacă inoculii au constat din boboci, cu diametrul de circa 3 mm, după trei luni de la inocularea lor pe medii cu excedent de citochinină (fig. 28C și 29), aceștia au dat naștere la numeroase plantule, regenerate mai ales din pistilele florilor situate în centrul inflorescențelor (fig. 29), tulpinile lor răzbătând în afara bobocului; dacă procesele de anteză au fost prea avansate, bobocii au înflorit, dar la locul de secțiune al pedunculului s-au regenerat numeroase neoplantule și mugurași (fig. 28D).

La violetele africane (*Saintpaulia*) (fig. 30A-C), din explantele constând din frunzuliță, pețiol sau numai din limb foliar, pe medii cu raport echilibrat auxină/citochinină, s-au regenerat atât mugurași foliari, cât și rădăcinițe; cea mai ridicată capacitate organoformatoare a fost constatată la nivelul explantelor de tip pețiol (fig. 30A) și la baza minibutașilor de limb foliar. Dacă inoculii au constat din boboci, de 2-3 mm diametru, pe medii cu excedent de citochinină, la nivelul buzei petalelor, în partea lor superioară (fig. 30B), au luat naștere numeroși mugurași, din inocul rezultând – în circa 3-4 luni de vitrocultură – o colonie (tufă) de frunzulițe care au invadat întreg lumenul eprubetei (fig. 30C). Din acest conglomerat de frunzulițe, au putut fi individualizați propaguli sau minibutași, constituiți din frunzulițe, utilizați ca inițiatori de subculturi, în micropropagare.

La freesia (*Freesia*) (fig. 31A-C), inoculii constând din apex de tulpină (fig. 31A) au crescut repede pe medii cu un raport de 1 între auxină și citochinină. Dacă s-au folosit inoculi boboci, la care încă nu se evidențiau corolele (fig. 31B), în cca 4-5 luni de vitrocultură (după o perioadă de cca trei luni de întuneric continuu, urmată de o expunere a culturilor la lumină continuă), pe medii cu excedent de citochinină, s-a observat – din zona

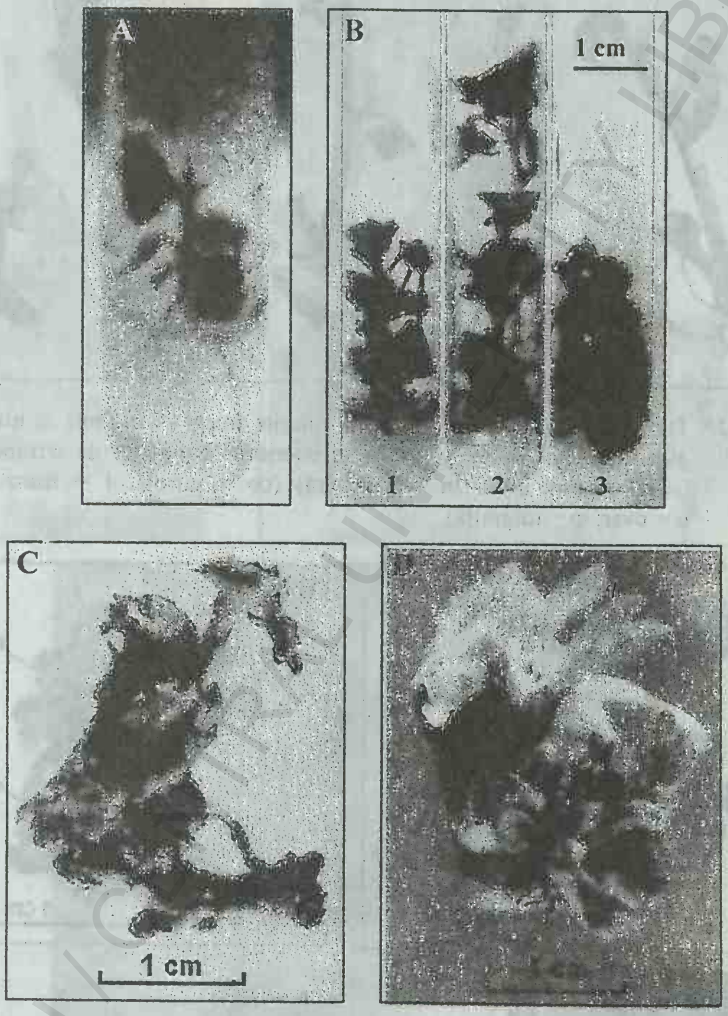


Fig. 28. Morfogeneza la nivelul explantelor de crizanteme, unde: A – cultură de meristem caulinar, apical, pe mediu de bază cu AIA 1 mg/l; B – apexuri de crizanteme cultivate pe medii de bază lipsite de regulator de creştere (1); cu amestec de 1 mg/l AIA cu 1 mg/l Kin (2) şi cu 2 mg/l BA (3); C şi D – boboci, inoculaţi în preanteză, pe medii cu excedent de citochinină, prezintă caulogeneză fie în centrul bobocului (C), fie din zona de secţionare a pedunculului floral, cu înflorirea bobocului (D)

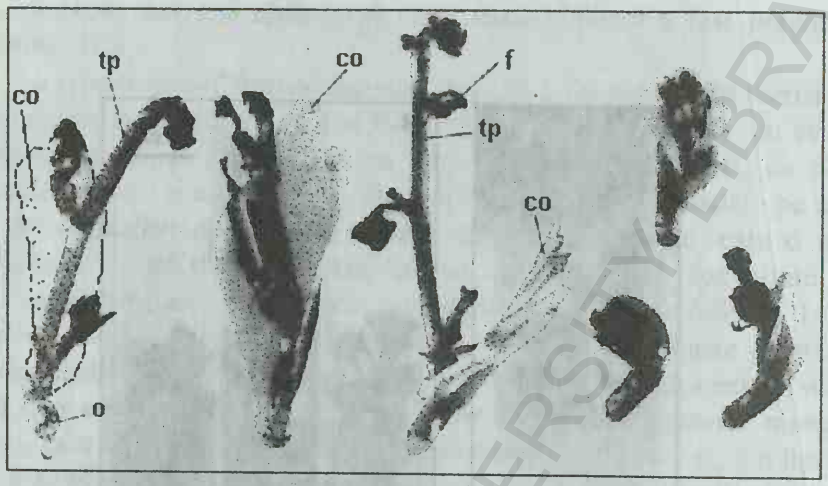


Fig. 29. Detalii privind caulogeneza – în diferite trepte – întâlnite la nivelul gineceului din florile prezente în interiorul bobocilor de crizanteme (soiul Aglow afalţi în vitrocultură) (co = corolă; f = frunzuliţă; o = ovar; tp = tulpiniţă)

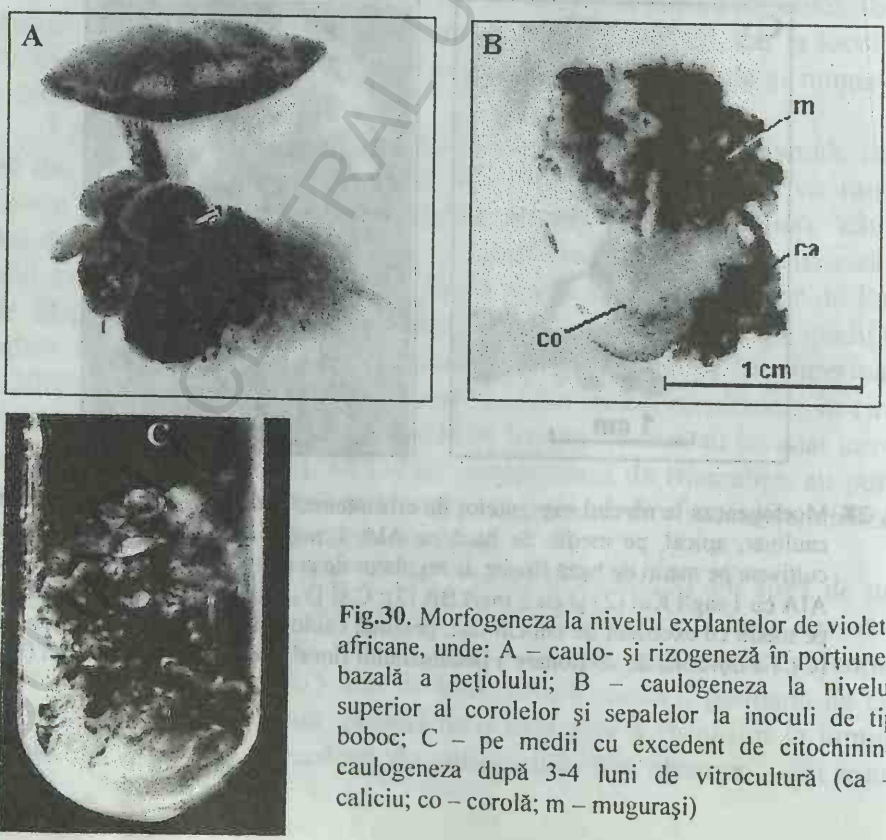


Fig.30. Morfogeneza la nivelul explantelor de violete africane, unde: A – caulo- şi rizogeneză în porţiunea bazală a peţiolului; B – caulogeneza la nivelul superior al corolelor şi sepalelor la inoculi de tip boboc; C – pe medii cu excedent de citochinine caulogeneza după 3-4 luni de vitrocultură (ca – caliciu; co – corolă; m – muguraşi)

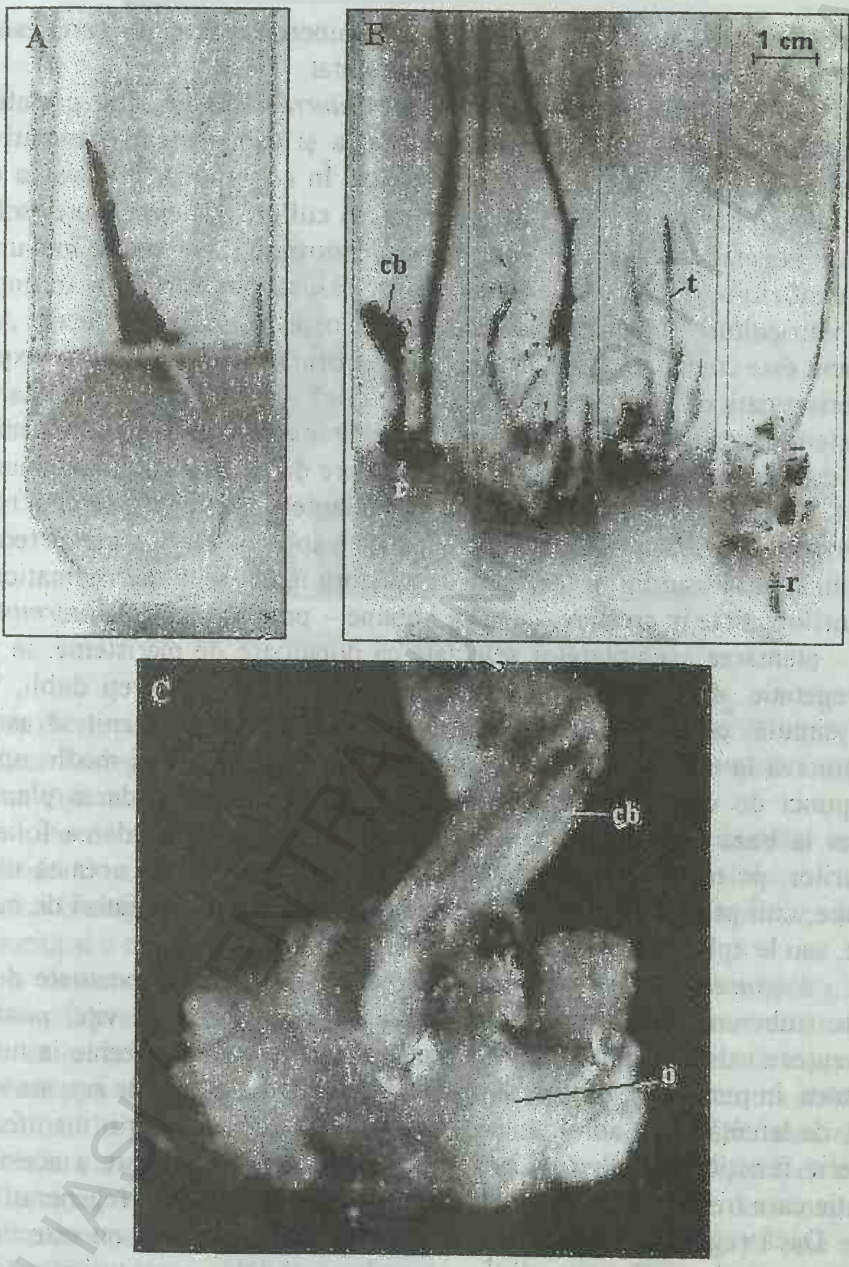


Fig. 31. Morfogeneza la nivelul explantelor de freesie, unde: A – apex caulinar cultivat pe mediu de bază cu 1 mg/l AIA și 1 mg/l Kin; B-C – inoculi boboci cu morfogeneză, după 4-5 luni de vitrocultură, pe mediu cu excedent de citochinine (cb – corolă boboc; o – ovar cu muguri; t – tulpiniță; r – rădăciniță)

BCU IAȘI EXTRAS

bazală a ovarului (fig. 31C) – naşterea a numeroase tulpinițe, procesul de rizogeneză fiind întârziat şi mai slab reprezentat.

La înființarea unei vitroculturi, *procedurile de asepsizare* pot afecta, uneori, într-o foarte mare măsură, vitalitatea şi capacitatea regenerativă a celulelor sau țesuturilor cormofitoinoculilor. În consecință, prelevarea unui material vegetal de la plante mame aflate în culturi protejate (sere, solarii, case de vegetație, camere de creştere sau fitotroane), menținute într-un regim ecofiziologic controlat, constituie o măsură binevenită în înființarea unei vitroculturi, fiind depăşită, cu succes, o primă etapă de lucru. Acest moment este crucial, mai ales atunci când se urmăreşte recoltarea de explante meristematice – apicale sau axilare (laterale) – de la plante mame care au meristemele golaşe, sau mai slab protejate de învelişurile externe ale mugurilor, cum ar fi apexurile şi meristemele axilare de pe tulpinile unor soiuri de cartof. Tot un caz special este întâlnit şi la plantele mame supuse unui regim de *termoterapie*, menit să stopeze – pe durata aplicării tratamentelor termice – replicarea virusurilor şi răspândirea acestora în celulele meristematice ale apexurilor aflate în creştere, ceea ce impune – prealabil aplicării *termoterapiei* – plantarea exemplarelor selectate ca donatoare de meristeme, în vase de vegetație, de construcție specială, respectiv vase cu pereți dubli, între care circulă, pe durata termoterapiei, un agent frigorific menit să asigure menținerea la nivelul sistemului radicular a unei temperaturi medii, optime din punct de vedere fiziologic (vezi fig. 32), precum şi udarea plantelor numai la baza acestora, la nivelul solului, fiind interzisă udarea foliară a culturilor, pe toată perioada de aplicare a termoterapiei. În această ultimă situație, unii practicieni nici nu mai dezinfectează lăstarii donatori de meristeme, sau le aplică doar o îmbăiere rapidă în alcool de 70^0.

Regimul în care sunt *păstrate* organele de rezervă donatoare de explante (tuberculi, bulbi, rizomi etc.), butaşii sau corzile de vițe, poate să influențeze calitatea mugurilor, respectiv a meristemelor prezente la nivelul acestora; în perioada de iarnă, mugurii trec printr-un stadiu de *repaus vegetativ*, de latență (perioadă în care atât organele, cât şi mugurii, manifestă o regresie funcțională, chiar şi în condiții optime de depozitare a acestora), situație care trebuie depăşită în momentul inițierii proceselor regenerative *in vitro*. Dacă regimul ecofiziologic din spațiile de depozitare nu este corespunzător menținerii funcționalității normale a celulelor constitutive a potențialilor inoculi, se poate produce o alterare a stării fiziologice a acestora –în situația în care regimul termic şi hidric, la nivelul meristemelor, este inadecvat – ele necrozându-se, mai ales în caz de îngheț, sau de temperaturi crescute, umiditate ridicată şi ventilație deficitară, când acestea trec într-un

Fig. 32. Garoafe plantate în vase de vegetație cu sistem de răcire, utilizate în camerele de termoterapie

proces de respirație anaerobă, respectiv de fermentație. Astfel de situații pot conduce la degradarea parțială, sau chiar la compromiterea totală a calității și vitalității materialului biologic, în special a meristemelor.

Pe de altă parte, un control *fitosanitar* eficient al plantelor mame, donatoare de explante, ne poate ajuta în alegerea – pentru inoculare – a unui material biologic de calitate, fapt care va asigura viitorilor inoculi o vitalitate sporită și o capacitate regenerativă maximă.

Selectarea din punct de vedere calitativ a materialului biologic din care vor fi prelevate explantele ce vor servi la înființarea unor vitroculturi, joacă un rol hotărâtor nu numai în ceea ce privește reușita realizării acestora, a influențării creșterii lor, ci și în controlarea evoluției ulterioare a culturilor respective, în primul rând în obținerea tipului de cultură dorit, mai ales în situația în care se urmărește organizarea unor experimente. Astfel, de exemplu, în cazul în care se dorește efectuarea unor experimente demonstrative, de hibridare somatică, pentru obținerea culturilor de protoplaști este preferabilă utilizarea de celule tinere, cu cloroplaste, care să poată fi apoi cocultivate cu protoplaști proveniți din țesuturi lipsite de cloroplaste. În acest mod, în câmpul microscopic, fuziunea celor două tipuri de protoplaști va putea fi mai ușor urmărită. Alteori, atunci când se urmărește obținerea de calus, sau de suspensii celulare producătoare de compuși secundari de meta-

bolism, trebuie să prelevăm celule din acea parte de plantă (sau plantulă), care deține celule cu o asemenea capacitate biosintetică. De exemplu, la *Berberis*, suspensiile celulare producătoare de principii active, cu precădere de berberină, trebuie inițiate dintr-un calus derivat din radicele de plantule. În schimb, dacă dorim să obținem o vitrocultură "liberă de viroze", inoculii – în cultura primară – vor consta exclusiv din explante meristematice, apicale sau axilare, cu dimensiuni de sub 0,5 mm, preferabil de 0,25 mm, posibil de prelevat numai la stereomicroscop. În schimb, pentru obținerea de vitroplantule haploide nu putem utiliza decât culturile de antere sau de ovule, respectiv de polen ori de saci embrionari, pentru inoculări materialul vegetal trebuind să fie prelevat în anumite stadii de preanteză.

În *subcultură*, criteriile de alegere ale materialului biologic sunt de altă natură; dar, şi în acest caz, scopul urmărit în final, precum şi tipul de cultură avut în vedere să fie realizat, joacă un rol hotărâtor. Astfel, chiar şi în practicile de micropropagare, natura *mini-* sau *microbutaşilor* (explante caulinare, uni- sau multinodale, prelevate din zona bazală sau apicală a vitroplantulelor, ori utilizarea de frunzulițe etc.), a *propagulilor*, ori a *protocormilor*, la orhidee (întregi sau secționați, ori a glomerulelor), sau, mai rar, a calusurilor, exercită o mare influență asupra evoluției cormofitoinoculilor în subcultură, atât în ceea ce priveşte viteza de creştere, cât şi obținerea morfogenezei scontate, amplitudinea şi calitatea acesteia. Evident că, în cazul în care dorim să inițiem o suspensie de celule ne putem folosi de o cultură primară sau de o subcultură de calus, preferabil *friabil*, sau de un macerat de mezofil foliar, ori de protoplaşti, care – după o perioadă de vitrocultură – se transformă într-o suspensie de celule. Alteori, subculturile se impun ca o necesitate în scopul repicării unei vitroculturi care fie că a crescut prea mult şi a umplut vasul de cultură, fie a epuizat mediul în care se află, fie dă semne de senescență, sau a desorbit fenoli în substratul de cultură (ce prin oxidare brunifică mediul şi încetineşte sau opreşte creşterea inoculilor, mai ales la unele esențe lemnoase), situație în care subcultura este obligatoriu de executat, chiar şi la scurt timp de la inoculare (în primele 3-4 zile), altfel inoculii mor.

Aspectele care trebuie urmărite în alegerea materialului biologic, destinat culturilor primare sau a subculturilor, sunt diverse şi complexe, şi numai o bună informare (documentare) a operatorului îi va servi acestuia în luarea tuturor măsurilor care se cer avute în vedere înainte de inoculare. Altfel, atingerea scopului final poate fi compromisă.

3.5.2.2. Caracteristici *morfofiziologice* ale viitorilor cormofitoinoculi

Cormofitoinoculii, în momentul amplasării lor *in vitro*, trebuie să prezinte o caracteristică comună, aceea că – pentru asigurarea supraviețuirii țesuturilor și celulelor inoculate – cel puțin o treime dintre celulele *componente trebuie să fie vii*, iar pereții lor celulari să fie pectocelulozici, nemodificați secundar. Nu trebuie scăpat din vedere faptul că viabilitatea celulelor poate fi afectată în decursul sau în urma asepsizării materialului biologic.

Capacitatea regenerativă a cormofitoinoculilor se va manifesta mult mai rapid și mai amplu la explantele în ale căror structuri se află *meristeme* (primare sau secundare), întrucât în lipsa unor astfel de țesuturi, cu celule ce au ca funcție de bază, permanentă, multiplicarea mitotică, procesele regenerative sunt lente sau chiar imposibil de declanșat, iar dediferențierea este de lungă durată, fapt care tergiversează demararea proceselor regenerative la nivelul vitroculturilor și creșterea acestora. Cormofitoinoculii care dețin un procent ridicat de celule diferențiate, în vitrocultură pot eșua, sau pot să se mențină o lungă perioadă de timp vii, fără să manifeste procese regenerative, respectiv multiplicare celulară, creștere și dezvoltare, în final ele necrozându-se. Procesele de *dediferențiere* se instalează numai dacă celulele diferențiate primesc impulsuri hormonale care să deblocheze factorii endogeni responsabili de stoparea multiplicării celulare și dacă celulele în cauză sunt reactive la astfel de stimuli. Țesuturile necrozate sau mortificate, sau cele puternic modificate secundar (sclerozate sau suberificate), în momentul dimensionării explantelor trebuie îndepărtate de la nivelul viitorilor inoculi, deoarece astfel de celule pot deveni bariere care izolează țesuturile și celulele vii, de mediul de cultură, împiedicând alimentarea acestora și realizarea schimburilor dintre celulele aflate în vitrocultură și mediul de cultură, sau chiar îndeplinirea – la un nivel satisfăcător – a proceselor de respirație, de nutriție și, acolo unde este cazul, a fotosintezei, respectiv a schimbului de gaze. Caracteristicele morfofiziologice ale explantelor depind, într-o foarte mare măsură, de *proveniența acestora*, prin proveniența explantelor subînțelegându-se, în principal, următoarele aspecte:

- **originea explantelor**: *specie*, *varietate*, *clonă*, *linie*, sau *tip* de *vitrocultură* din care provin inoculii (cultură primară sau subcultură), a câtea subcultură este etc.;
- **regimul ecologic** din care provin plantele mame sau organele donatoare de explante: din *teren* deschis, din *sere*, din *vitroculturi* derivați direct din camera de creștere sau din depozite de *criocon-servare*, ori de la vitroplantule, postaclimatizare;

- **poziția și expoziția deținută de explante în corpul plantei** de origine sau a organului din care a fost confecționat explantul, ori a amplasamentului deținut de viitorul inocul pe vitroplantula de la care se dimensionează minibutași sau propaguli ș.a.m.d.

În vitroculturile vegetale, se va ține seama de faptul că se pot înregistra reacții diferite, pe același tip de mediu de cultură, la explante aparent *omoloage* din punct de vedere biologic (morfologic, ca etapă și sezon de dezvoltare), dar diferite *fenotipic*. De exemplu, la gerbera înființarea unei culturi *in vitro* din explante de calatidiu este operabilă – cu bune rezultate – în special la soiurile cu flori roșii (după *Murashige*, 1974), folosindu-se inflorescențe aflate în fază de boboc tânăr.

Adeseori, o mare variabialitate de reacție se poate constată la explante de același tip morfofuncțional (de exemplu la meristemele caulinare), recoltate de pe o aceeași plantă. De exemplu, mugurii cu *amplasamente* diferite pe tulpini sau pe ramuri, respectiv situați în vârful, mijlocul sau la baza acestora, prelevați de pe ramuri ortotrope ori plagiotrope, de pe ramuri cu expunere variată în ceea ce privește umbrirea, solarizarea, sau distanță – în linie dreaptă – în raport cu rădăcina etc. *in vitro* pot manifesta o reacție variată. Acest fenomen poate fi observat chiar și la minibutașii dimensionați din vitroplantule, de exemplu de garoafe sau de crizanteme, recoltați de pe tulpinițe din zona apicală, mijlocie sau din cea bazală. Pe de altă parte, la plantele lemnoase, zona topografică cea mai apropiată de polul radicular, în vitrocultură este mai pozitiv reactivă, decât aceea a explantelor similare prelevate din zone mai îndepărtate de rădăcină, deoarece primele sunt mai bine aprovizionată cu apă, cu nutrienți și cu fitohormoni (mai ales cu cei ce sunt sintetizați în rădăcină). Astfel, meristemele apicale, prelevate din extremitățile ramurilor unor arbori multianuali, manifestă o reacție mult diferită de aceea a meristemelor apicale recoltate de la drajonii situați în apropierea polului radicular. În dependență de *originea* explantelor, se poate remarca și o variată capacitate regenerativă și organoformatoare, chiar și la țesuturi care îndeplinesc o aceeași funcțiune, de exemplu meristemele, acestea fiind diferite la țesuturile de tip primar, în raport cu reacția manifestată de explante similare ca dimensiune, dar prelevate din țesuturi secundare, în cazul exemplificat fiind vorba de meristeme secundare. Pe de altă parte, *meristemele primare* localizate în vârfurile rădăcinilor sau în cele ale tulpinilor, la nivelul nodurilor (la graminee), la baza unor inflorescențe ori a bracteelor, sau în straturile mai profunde ale organelor (de exemplu la nivelul fasciculelor libero-lemnoase, colaterale sau bicolaterale deschise), ce asigură creșterea acestora, în vitrocultură manifestă reacții diferite, în cadrul

aceleiaşi specii sau cultivar, cu particularităţi de comportament în funcţie de tipul şi regimul de cultură. De altfel, chiar şi în natură, în decursul vieţii plantelor există diferenţe de manifestare fiziologică între meristemul apical şi meristemele axilare, fenomen cunoscut sub numele de dominanţă apicală. La sparanghel, mugurii caulinari (axilari sau cei adventivi), de pe o aceeaşi plantă, posedă o capacitate regenerativă şi organoformatoare diferită. Astfel, inoculii meristematici prelevaţi de pe lăstarii vegetativi manifestă o aptitudine rizogenă mai mare şi mai accelerată, în raport cu acelaşi tip de meristeme provenite de la tulpini comestibile, care dovedesc o capacitate rizogenă mai scăzută (*Margara*, 1982). Meristemele de profunzime, cele *primare*, originare din foiţele histogene (cum sunt *procambiul*, respectiv *cambiul intrafascicular*), sau cele *secundare*: *felogenul* (stratul generator suberofelodermic, amplasat în vecinătatea suprafeţei tulpinii) şi *cambiul* (stratul generator libero-lemnos, situat în tulpinile sau a rădăcinile îngroşate secundar), prezente la plantele lemnoase, ori în structurile unor organe metamorfozate, cum sunt cele ce caracterizează rădăcinile metamorfozate de morcov, pătrunjel, sfeclă etc. manifesă capacităţi particulare de reacţie, care rezidă în multiplele diferenţe structurale şi funcţionale existente la nivelul acestora, comportament care provine, probabil, şi din faptul că celulele lor nu au o origine comună.

Reacţia cormofitoinoculilor este dependentă şi de *vârsta* plantei sau a organelor donatoare de explante, dar şi de vechimea vitroculturilor, la subcultură contând şi durata de timp scursă din momentul inoculării primare, precum şi numărul de repicări suportate de cultură, în antecedenţă. În general, se recomandă iniţierea unei culturi din explante prelevate de la organe cât mai tinere, sau din plantule provenite din seminţe germinate în condiţii aseptice, ori din vitroplantule. Această metodă se practică atât la speciile lemnoase, cât şi la cele ierboase. La plantele multianuale, lemnoase, adeseori se recomandă aplicarea unor proceduri de *juvenilizare*, în vederea explantării de meristeme mai active, forţându-se formarea de drajoni, prin decopertarea rădăcinilor, sau prin rezectarea trunchiurilor arborilor la nivelul coletului, ori printr-o tăiere dirijată a ramurilor bătrâne, sau prin cultivarea *in vitro* a brahiblastelor, în scopul inducerii creşterii mugurilor normali sau a celor dorminzi etc. Obţinerea de vitroplantule din explante prelevate de la tulpini sau ramuri tinere, în general nu ridică probleme deosebite. Dificultăţile cresc în cazul utilizării unor inoculi ce provin de la plante în vârstă de 5 ani şi se amplifică, într-o şi mai mare măsură, atunci când sunt prelevate explante (chiar meristeme fiind) de la copacii în vârstă de 10 ani, sau de la arbori seculari. Adeseori, aplicarea unor *tratamente* termice la

nivelul ramurilor (constând în menţinerea acestora – o perioadă de timp – la 5°C sau, dimpotrivă, păstrându-le în apă încălzită la 30°C, timp de 48 de ore), ori a unor *regulatori de creştere*, sau a unui anumit regim de iluminare, plantelor ori ramurilor donatoare de explante, constituie măsuri binevenite care ridică procentul de supravețuire a celulelor inoculilor, facilitând forțarea proceselor regenerative la nivelul celulelor explantelor, în momentul amplasării lor *in vitro*. Pentru stimularea declanşării proceselor regenerative, postinoculare, şocurile termice, sau un anumit regim de iluminare a culturilor, pot acționa, uneori, ca impulsuri stimulatoare, imprimând vitroculturilor o evoluție favorabilă..

În cazul speciilor lemnoase, un efect de reîntinerire a celulelor domului meristematic, atunci când cultura de meristeme eşuează, constă în *microgrefarea* acestuia *in vitro*, pe o plantulă devenită portaltoi, obținută prin germinarea *in vitro* a semințelor speciei respective, sau a unei specii înrudite genetic. Această practică este frecvent utilizată la *Citrus* şi la piersic, plante care se înmulțesc foarte greu *in vitro*, prin tehnicile clasice de culturi de meristeme (vezi *Navarro* şi colab., 1975). *Deogratias* (1987) a utilizat tehnica de microgrefare *in vitro*, în micropropagarea cireşului. *Jonard* şi colaboratorii (1983) au modificat întrucâtva practica de microgrefare, interpunând între altoi şi portaltoi – la locul de inserție al altoiului pe portaltoi – un antioxidant (dietilditiocarbonat de sodiu) sau o citochinină, instilate într-o picătură de geloză (după *Boxus* şi colab., 1995). La pomii fructiferi, asemenea practici sunt utile şi pentru analizarea compatibilității în altoire. În plus, prin tehnicile de microgrefare, în paralel cu juvenilizarea, s-a realizat şi eliminarea din plantele regenerate din domul meristemat, folosit ca grefon, a virusurilor NRSV, la prun şi PDV, la piersic şi la unele soiuri de prun (după *Boxus* şi colab., 1995).

De reținut este faptul că, *îmbătrânirea* plantelor nu este numai cronologică, ci unii factori climaterici, atipici, pot provoca şi grăbi o îmbătrânire precoce a organelor, a țesuturilor sau a celulelor, cu intrarea acestora în senescență, decalându-se momentul în care se finalizează diferențierea profundă, ireversibilă, a celulelor, precum şi moartea unor celule, situație de care trebuie să se țină seama atât în alegerea naturii şi dimensiunii explantelor, cât şi a momentului explantării.

În general, este recomandabil ca explantele să fie prelevate, dacă nu de pe plante tinere, pe cât posibil din zonele cele mai *tinere* ale organelor. Pentru o mai sigură dezinfectare a materialului vegetal, fără afectarea vitalității viitoarelor explante (de exemplu a meristemelor), se recomandă utilizarea mugurilor, ei fiind, de regulă, bine ocrotiți de țesuturi protectoare, spe-

ciale. De altfel, formațiunile morfoanatomice avute în vedere ca potențiale donatoare de explante pot fi acoperite din timp, cu pungi din material plastic, transparent și incolor, ceea ce asigură o mai bună protejare a frunzelor și mugurilor de contaminare cu variați germeni și ușurează asepsizarea acestora, oferind explante de o mai bună calitate și vitroculturi cu risc mai scăzut de infectare. În general, există o corelație între *localizarea* explantului și *gradul lui de contaminare* cu germeni. Cu cât explantul provine din profunzimea unui organ sau țesut, cu atât va fi mai redusă infestarea lui cu germeni. Cu toate acestea, există și cazuri în care, în vitrocultură ne confruntăm cu prezența unor endocontaminări a celulelor, mai ales cu bacterii conținute în vasele conducătoare. În anumite situații, la unele specii lemnoase, se poate accepta o cocultură a unor astfel de microorganisme, cu inoculul cormofitic. De regulă, însă, organele subterane și cele apropiate de sol, sau cele care provin din mediul acvatic, ori care au o pilozitate ridicată, sau cele care prezintă denivelări morfologice pe organe, sunt mai puternic contaminate cu germeni și, în consecință, sunt mai greu de asepsizat.

Materialul vegetal donator de explante, prelevat de la plante sau organe care provin din diverse *condiții ecologice*, posedă nu numai un grad diferit de contaminare, dar și *particularități* în ceea ce privește *capacitatea lor adaptativă* la variații factori ecologici ai mediului natural. În general, este de preferat ca inoculii să provină de la plante aflate în condiții pedoclimatice controlate, în unele cazuri chiar aflate într-un regim nutrițional special de cultură, tratate fiind cu anumiți regulatori de creștere. De exemplu, la speciile lemnoase se recomandă – pentru prelevarea de meristeme – recoltarea de material vegetal toamna târziu, de la plante sau organe care au mugurii în repaus, fiind mai bine protejate de infestare cu diferiți germeni. În cazul în care urmărim obținerea de forme vegetale rezistente la anumite condiții de mediu, este de preferat să prelevăm explante de la plante care provin dintr-un mediu în care ele au dobândit deja o anumită rezistență la factorii pe care îi avem în vedere să-i utilizăm ca agent de presiune în selecție, respectiv la agenți poluanți sau fitopatogeni, la noxe, biotoxine, sărăturarea, extreme termice etc.

Reacția cormofitoinoculilor este dependentă nu numai de natura și vitalitatea celulelor, ci și de *proporția* diferitelor tipuri de țesuturi care intră în alcătuirea acestora, și de *funcțiile* pe care le-ar fi îndeplinit țesuturile sau celulele inoculilor, la *locul lor de origine*. Uneori, alături de meristemele apicale sau axilare (mai ales la explantele constând din muguri florali, sau inflorescențiali), odată cu dimensionarea explantelor meristematice sunt prelevate și alte țesuturi, subiacente domului meristematic, cum ar fi 1-2 sau

mai multe primordii foliare, bractelae, inflorescențiale sau florale (de sepale, petale, androceu, gineceu, alături de receptacul, peduncul ori de rahis), în cazul florilor, în dependență de stadiul de anteză, de specie şi soi, de tipul florilor (unisexuate, hermafrodite, sau înflorescențe) şi mărimea acestora. Diferențele funcționale – existente între explante similare din punct de vedere morfologic – sunt surprinse, uneori, abia în momentul în care inoculii cultivați fiind pe medii aseptice sunt comparați între ei, în ceea ce priveşte capacitatea lor organoformatoare, caz în care se pot constata particularități de reacție, care rezidă în diferențierile fiziologice sau biochimice existente în celulele ce alcătuiesc inoculul, totipotențialitatea lor fiind limitată în exprimare, neputându-se exterioriza; în asemenea situații, adeseori, balanța fitohormonală prezentă în mediul de cultură şi regimul ecofiziologic adoptat pentru creşterea vitroculturilor, sunt tot atâția factori care – dacă se armonizează cu cei endogeni – pot susține manifestarea integrală a omnipotenței celulelor inoculate.

În vitrocultură, modul de manifestare al explantelor este, într-o foarte mare măsură, dependent de *interrelațiile* şi *influențele* suferite de celulele ce vor deveni inoculi, în perioada în care ele s-au aflat integrate în biostructuri, la locul lor de origine, inserate fiind între diferitele structuri şi tipuri celulare, în cadrul unui țesut, organ, respectiv în planta integră. În dependență de această moştenire se poate, sau nu, să se înregistreze o receptare particulară, favorabilă ori nefavorabilă, a condițiilor ecologice externe, condiții care se pot, sau nu, armoniza cu cele interne (tisulare sau celulare), situații care se pot traduce diferit, în plan endogen, şi se pot exterioriza variat, la nivelul explantelor inoculate *in vitro*, cormofitoinoculii – mai ales în cultura primară – pot să dețină o populație de celule care-şi pot, sau nu, manifesta *integral* calitățile regenerative şi cele de morfogeneză, starea fiziologică a celulelor influențând chiar şi supraviețuirea inoculului; în astfel de cazuri, contează nu numai rezerva endogenă de nutrienți şi de fitohormoni, ci şi anumite compartimente genetice şi metabolice (energetice), care blocate fiind impun o deblocare, celulele necesitând adeseori o stimulare exogenă, pentru a deveni apte de a recepta şi decodifica mesajele sau impulsurile interne, sau cele provenite din mediul exterior. Această interrelație a "complexului endogen", adeseori cu grad ridicat de specificitate, explică reacția la factorii exogeni de o manieră particulară a diferitelor tipuri de explante, ce dețin o componență celulară aparent identică, dar nu şi o aceeaşi competență, întrucât aflate într-un acelaşi regim de cultură, explante morfologic similare, prin manifestările lor dovedesc diferențe fiziologice, biochimice, respectiv metabolice şi, nu în ultimul rând, genetice.

După multiplicare, celulele nou formate cresc. *Creşterea* este un fenomen fiziologic comun tuturor vieţuitoarelor, rezultantă a însumării dimensiunilor celulelor, ţesuturilor şi a organelor componente. La plante, celule derivate dintr-o multiplicare a meristemelor, în urma unor intense reacţii de sinteză de noi şi noi compuşi, şi prin acumularea de substanţe în biostructuri sau ca materii de rezervă ajung, treptat, la o *mărire ireversibilă a taliei* lor, a ţesuturilor, organelor şi, în final a întregului organism. Procesul de creştere celulară, respectiv *extensia* pereţilor şi mărirea volumului celular se produce gradat şi definitiv, până la atingerea formelor şi a dimensiunilor lor caracterisice, prestabilite filogenetic. În momentul în care celula se apropie de talia normală, aceea corespunzătoare unei celule adulte, se încheie creşterea se stabilizează metabolismul specific al acesteia, dobândeşte un anumit statut funcţional şi îşi desăvârşeşte diferenţierea morfostructurală. În vitrocultură, în dependenţă de tipul de cultură, de condiţiile ecofiziologice din *vitro* şi din camera de creştere, celulele pot atinge un anumit nivel de manifestare a aptitudinilor lor metabolice şi de diferenţiere, pe medii aseptice cormofitoinoculii evoluând însă altfel decât dacă celulele în cauză s-ar fi aflat încorporate la locul lor de origine, *in vitro* talia plantulelor şi a organelor fiind miniaturală, cu atât mai mult cu cât *in vitro* ele prezintă un mod de *nutriţie* preponderent *heterotrof* sau *mixotrof* (fotomixotrof), mai rar fotoautotrof.

Celulele care compun ţesuturile şi organele unei plante, ca de-altfel şi în vitroculturi, nu posedă un acelaşi *ritm* şi *grad* de multiplicare şi de creştere, atât timp cât ele se află integrate sistemului unitar al organismului sau organului cărora le aparţin, fiind subordonate unor conexiuni fiziologice şi moleculare intercelulare, intertisulare şi interorgane; în momentul în care această "subordonare" este întreruptă, odată cu desprinderea celulelor din organismul sau din structurile în care în mod natural se află încorporate, trecute şi crescute fiind *in vitro*, în regim autonom (de exemplu ca celule sau protoplaşti izolaţi), ele pot dobândi noi caracteristici funcţionale, diferite de acelea avute atât timp cât celulele s-au aflat amplasate în ţesuturi şi organe; ajunse *in vitro*, celulele îşi pierd statutul de interdependenţă şi pot fi menţinute într-o stare *primară* de organizare, stare care poate fi perpetuată în regim de subcultură; dacă repicarea vitroculturilor se execută la timp, se forţează menţinerea caracterului juvenil al celulelor, stimulându-se multiplicarea acestora, împiedicându-se asocierea lor în conglomerate celulare, cu tendinţe de diferenţiere şi formare de ţesuturi. Structurile lignificate (xilogeneza), în vitrocultură, determină intrarea culturilor în senescenţă, mai ales dacă nu apar noi elemente meristematice şi procese de morfogeneză.

Una dintre importantele condiții fiziologice pe care trebuie să le îndeplinească materialul biologic destinat prelevării de explante este ca celulele sale să fie *turgescente*. În momentul inoculării, explantele nu au voie să sufere de deshidratare, întrucât aceasta ar putea să le afecteze vitalitatea. Turgescența celulelor trebuie să se păstreze la un nivel optim, pe toată perioada de cultură, în caz contrar, celulele inoculilor vor muri. În lipsa turgescenței sunt deficitare schimburile dintre celule și mediul de cultură, este împiedicată absorbția, respirația, multiplicarea și creșterea celulară, respectiv a culturilor, și desfășurarea proceselor vitale. În consecință, pe tot parcursul operațiunilor, materialul biologic – recoltat din natură sau luat din vitrocultură – trebuie ferit de deshidratarea, fie prin desicare, fie prin exosmoză. Menținerea celulelor aflate în vitrocultură într-o stare optimă de turgescență este o problemă delicată, în special în cazul culturilor de protoplaști, când numai un echilibru izoosmotic strict controlat permite conservarea integrală a capacităților vitale ale acestora și a aptitudinii lor de fuziune, în procedurile de hibridarea somatică, concomitent cu supraviețuirea hibrizilor obținuți.

Adeseori, mai ales atunci când dorim să realizăm anumite tipuri de vitroculturi – de exemplu obținerea de *haploizi – momentul optim* de prelevare a explantelor este *limitat*, dimensionarea materialului vegetal și inocularea acestuia, pentru andro-și ginogeneză, trebuind să se facă imediat după ce în celulele mame ale gameților a avut loc diviziunea meiotică (reducțională). Dacă prelevarea anterelor (respectiv a sacilor polinici) sau a ovulelor se face cu întârziere, se poate ca celulele lor să nu mai aibă capacitatea de a regenera haploizi, în cultură formându-se vitroplantule diploide, din celulele somatice prezente la nivelul inoculilor. La alte categorii de explante, acest moment este limitat la o anumită *fenofază*, etapă redusă ca durată în cadrul ciclului de dezvoltare ontogenetică. Astfel, în hibridările incompatibile, embrionii zigotici în formare se recomandă să fie prelevați doar într-un anumit *stadiu* de dezvoltare, la un număr strict de zile după fecundare, altfel vitalitatea lor poate să se piardă; în alte situații, se are în vedere prelevarea explantelor și inocularea acestora într-un anumit moment al dezvoltării plantulelor ori al formării florilor (în andro- și ginogeneză), sau al creșterii frunzelor, fructelor, ori a semințelor. La plantele perene, cu precădere la speciile lemnoase (arbuști, arbori sau pomi fructiferi), din zonele cu climat temperat, sezonul (toamna târzie, iarna, primăvara, vara sau sfârșitul de vară) imprimă variatelor structuri celulare și tisulare, modificări în ceea ce privește funcționarea organelor, țesuturilor și celulelor, numeroși factori endogeni, de endoreglare, prezentând oscilații sezoniere, în astfel de

perioade fitohormonii şi rezervele interne trecând prin schimbări (uneori radicale) calitative şi cantitative, ceea ce poate juca un rol în conservarea viabilităţii şi a totipotenţei celulelor şi ţesuturilor explantate şi inoculate *in vitro*, cu facilitarea sau blocarea exprimării capacităţilor lor morfogene, în vitrocultură, atât la explantele de dimensiuni macroscopice (muguri sau fragmente de organe, ori brahiblaste), cât şi la cele microscopice (meristeme, polen, celule, protoplaşti etc.), mai ales atunci când organele se află în fază de repaus vegetativ. Astfel, la plantele lemnoase, reuşita inoculărilor depinde foarte mult de sezon, de momentul recoltării, de condiţiile pedoclimatice în care au crescut plantele mame sau în care au fost păstrate – o perioadă de timp – ramurile donatoare de explante, în decursul stratificării lor în pivniţe, şi altele. Explantele meristematice ori mugurii, la pomii fructiferi sau la arbori, în zonele temperate se recomandă să fie recoltate şi inoculate, cu precădere, în perioada de latenţă a acestora. Dar, uneori, chiar şi la plantele ierboase se întâlnesc diferenţe sezoniere de competenţă morfofiziologică între explante omoloage, cum este cazul la hamei, unde mugurii inoculaţi pe medii aseptice după data de 16 aprilie manifestă o vitalitate redusă, în timp ce mugurii inoculaţi după data de 30 aprilie eliberează în mediul de cultură un compus de culoare neagră, ce – în decurs de 48 de ore de la explantarea şi inocularea acestora *in vitro* – produce necrozarea ţesuturilor. Numai mugurii recoltaţi şi inoculaţi până la jumătatea lunii aprilie supravieţuiesc şi pot da naştere la vitroculturi (*Street*, 1977a).

Sezonul, iar – legat de acesta – *stadiul* sau *faza* de vegetaţie în care se află plantele sau organele donatoare de explante, influenţează dezvoltarea vitroculturilor şi prin *acumulările* de apă, de nutrienţi şi de fitohormoni din celule şi ţesuturi, factori endogeni care, uneori, exercită un rol hotărâtor în păstrarea viabilităţii şi a capacităţii regenerative a ţesuturilor şi a celulelor, întrucât, după inoculare, natura şi nivelul compuşilor endogeni favorizează sau împiedică manifestarea deplină a totipotenţialităţii celulelor aflate în cultură, interferând pozitiv cu factorii de mediu.

Legat de sezon, vor fi respectate toate indicaţiile privind *asepsizarea materialului* vegetal, întrucât, uneori, în dependenţă de *sezon* există recomandări cu referire strictă la particularităţi de metodică, care ţin seama de încărcarea cu germeni a materialului biologic; natura, frecvenţa şi intensitatea infecţiilor variază cu stadiul de dezvoltare atins de plante şi de organe (inclusiv înălţimea acestora în raport cu solul), iar – legat de aceasta – poate să difere permeabilitatea ţesuturilor faţă de agenţii dezinfectanţi şi reacţia materialului biologic faţă de factorii climaterici din zonă (frig, ploaie, curenţi de aer, uscăciune). Abaterile de la metodică (recomandări prestabilite pen-

tru asepsizarea materialului biologic, la o anumită specie şi tip de explant, în funcție de sezon), pot ridica probleme complicate, uneori greu de soluționat, în ceea ce privește sterilizarea corespunzătoare a materialului vegetal, cu menținerea viabilității țesuturilor inoculate şi declanşarea proceselor regenerative postinoculare, respectiv de înființare a vitroculturilor. Dacă scopul nostru constă tocmai în urmărirea reacției explantelor în condițiile prelevării lor în epoci de vegetație improprii adaptării facile a celulelor la condițiile mediului aseptic, atunci vom interveni, în primul rând, în alegerea – prin tatonare – a unei game largi de asepsizanți, precum şi a inoculării explantelor pe medii în care vom adopta diferite combinații de regulatori de creştere, alcătuind variante constând în schimbarea naturii şi a raportului auxină/citochinină prezent în mediile de cultură.

În unele cazuri, de exemplu la culturile de protocormi de orhidee, se poate constata că, deşi vitroculturile respective se află în camere climatizate, în regim termic şi fotoperiodic diferit de acela existent în mediul natural, la mijlocul lunii februarie, protocormii manifestă un proces spontan de organogeneză, de amplitudine variabilă, în funcție de balanța hormonală din mediu, probabil ca răspuns al acestora la anumite impulsuri transmise de "ceasul lor biologic", excitații care se produc sub influența unor câmpuri sau stimuli energetici care acționează din afara camerelor de creştere, chiar şi în cazul în care culturile au fost menținute, timp de mai mulți ani (*Cachiță*, observații proprii), în regim de lumină continuă.

În ceea ce priveşte importanța *mărimii* şi a *formei* explantelor în evoluția ulterioară a acestora *in vitro*, este stabilit faptul că, în general, inoculul, respectiv explantul, pentru a se dezvolta în vitrocultură, potrivit scopului urmărit, trebuie să aibă o anumită *dimensiune*, considerată *optimă*. Dimensiunea *maximă*, *minimă* (limită) sau *optimă* a explantelor, în vitrocultură variază în funcție de specie, organ, tip de țesuturi şi de celule conținute în inocul, particularitățile de cultură, sezonul, densitatea inoculilor în cultură etc. *Pragul* minim de mărime trebuie respectat, altfel cormofitoinoculul nu-şi poate manifesta capacitatea lui regenerativă, respectiv totipotența celulelor sale. Dimensiunile *limită* ale inoculilor pot varia şi în funcție de *soi*, *fenofază*, grad de *dezvoltare* al plantelor sau organelor donatoare de explante, *natura compuşilor* din mediile de cultură, *condițiile* în care sunt crescuți inoculii, *starea* fiziologică a donatorilor şi a celulelor care compun explantul, ş.a.m.d. Când dintr-o aceeaşi sursă se doreşte confecționarea unui număr mai mare de explante, trebuie evitată variabilitatea de mărime, din cauza apariției unor deosebiri *anatomice*, în ceea ce priveşte proporția în inoculii prelevați dintr-un acelaşi organ, a unor componente histologice esențiale

(raport: celule meristematice/celule diferențiate, sau celule vii/celule senescente ori moarte), diferite de la un explant la altul, fapt care va face imposibilă compararea reacțiilor lor caracteristice, într-un anumit regim de vitrocultură. Mărimea limită a explantelor trebuie să fie astfel aleasă, încât după inoculare să se înregistreze un procentaj ridicat de supraviețuire, cu o conservare integrală a capacității regenerative și o creștere rapidă a vitroculturilor rezultate. Teoretic, nu există o dimensiune limită "critică", cu condiția ca intervalul de timp scurs între explantarea și inocularea țesuturilor să fie atât de scurt, încât să nu se deterioreze vitalitatea celulelor (de exemplu, din cauza *deshidratării* acestora), iar în decursul manipulării, *traumatizarea țesuturilor* să fie redusă la minimum. Totodată, condițiile ecofiziologice din *vitro* trebuie alese astfel încât ele să fie optime asigurării unei bune evoluții a inoculilor, chiar dacă aceștia au dimensiuni minime.

Pentru o manifestare cât mai rapidă și mai completă a capacității regenerative, celulele inoculate trebuie să găsească în mediul de cultură compușii strict indispensabili, și în concentrații optime, necesari – în primul rând – susținerii proceselor vitale; incubarea și creșterea vitroculturilor se impune să fie făcută într-un regim (termic și de iluminare) corespunzător asigurării integrării perfecte a explantelor la condițiile de vitrocultură, în vederea reluării proceselor de metabolism și a celor funcționale, pentru redobândirea aptitudinii de multiplicare a celulelor lor. Dar, de multe ori, traumele produse țesuturilor – pe parcursul asepsizării materialului vegetal sau a dimensionării explantelor – pot afecta profund vitalitatea și competențele inoculilor. Pentru asigurarea unui cât mai ridicat procent de viabilitate a explantelor este de preferat ca mărimea acestora să fie situată deasupra dimensiunii limită, alegerea făcându-se în funcție de specie, proveniența explantelor, fenofază, scopul urmărit în final, tipul de vitrocultură dorit etc. Se va evita ca traumatismul și stresul suferit de celulele inoculate să nu le fie fatal. Adeseori, explantele trebuie recoltate la stereomicroscop, cum sunt, de exemplu, explantele meristematice, caulinare, apicale sau axilare, prelevate și inoculate pentru obținerea de vitroculturi "libere de viroze", ori ovulele sau sacii embrionari, în ginogeneză; explantele mici sunt vulnerabile, în primul rând, la desicare, motiv pentru care prelevarea și inocularea acestora trebuie să se opereze cu mare rapiditate, mai ales în condițiile executării operațiunilor sub incidența unui curent de aer steril; alteori, o eroare de ordinul zecilor de microni, la explantele foarte mici, poate influența profund viteza de regenerare și de creștere a inoculilor și, uneori, chiar supraviețuirea acestora. Inoculii mult prea mici (în funcție de natura acestora, organul din care provin, specie, și altele), pot să se necrozeze ușor, cu atât mai

mult cu cât *orientarea lor polară*, normală, pe mediu solid, este dificil de realizat, ceea ce va împieta asupra demarării proceselor regenerative.

Explantele de dimensiuni mari prezintă avantajul unei mai rapide acomodări a lor *in vitro*, reluându-şi în scurt timp creşterea, ele deținând suficiente rezerve nutritive şi fitohormonale, *endogene*; dar, în astfel de situații, din cauza volumului mare al inoculilor intervine riscul unei sporite contaminări a acestora cu germeni. Pe de altă parte, explantele de dimensiuni prea mari, de ordinul centimetrilor, cresc repede şi necesită o mai rapidă repicare. Atât în inoculările efectuate în laboratoarele de cercetare, cât şi în cele de rutină (care se practică în condiții standardizate, la multiplicările *in vitro* de tip industrial), se are în vedere respectarea unor *norme* cu privire la mărimea şi uniformitatea explantelor, ori în ceea ce priveşte dimensiunea şi conformația minibutaşilor sau a propagulilor, mai ales în cazul operării de subculturi. Respectând aceste cerințe se va asigura nu numai un procent ridicat de viabilitate a inoculilor, ci şi înființarea sau inițierea culturilor dorite, respectiv regenerarea de vitroplantule sau formarea de calus, ori realizarea unei populații uniforme de celule, cu o evoluție previzibilă în timp (în condiții standardizate), şi cu reproductibilitatea rezultatelor, odată obținute.

Uneori, pentru o uniformă dimensionare a explantelor se utilizează perforatoare, din material inoxidabil, sau dispozitive tip ghilotină, confecționate din lame (de exemplu, din cele de bărbierit), montate în paralel, distanțate după dorință.

Alegerea dimensiunii, a *formei* şi a modului de amplasare a explantelor pe mediile solidificate sau pe punți (mai ales în experimentele comparative), se va face şi în ideea asigurării unui raport optim între suprafața de contact a țesuturilor inoculate, cu substratul de cultură, pentru a se facilita efectuarea schimburilor gazoase şi aprovizionarea cu apă, nutrienți şi cu regulatori de creştere a celulelor acestora. În plus, celulele traumatizate, după inoculare, desorb în mediul de cultură anumite substanțe, care pot juca un rol pozitiv – emisia de etilenă – în impulsionarea proceselor regenerative, respectiv în deterimarea intrării celulelor în diviziune şi, ulterior, în dediferențiere (*Street*, 1977a), ori, dimpotrivă, un rol negativ – fenolii – care cauzează necrozarea inoculilor. Adeseori, mai ales la rozacee, se recomandă inocularea mai multor explante într-un acelaşi recipient de cultură, fără ca densitatea lor să fie prea mare, ele influențându-se pozitiv, unele pe altele.

Ca modele experimentale, cu grad ridicat de omogenitate în reacție (condiție de bază în cercetare), sunt explantele confecționate din parenchimuri de rezervă, prelevate de la tulpinile subterane, cum sunt cele de topinambur, anghinare, cartof, ori din rădăcini metamorfozate de morcov, sau

din parenchim medular de tutun etc. Un astfel de material biologic, pe lângă că deține o mare capacitate regenerativă, prezintă avantajul faptului că dintr-un același organ pot fi dimensionate numeroase explante, uniforme ca mărime și structură morfoanatomică, și identice din punct de vedere fiziologic, sezonier și genetic, ceea ce face ca *in vitro*, din ele să se obțină culturi uniforme, care să se preteze cu succes la experimentele în care să se analizeze, comparativ, reacțiile inoculilor la prezența în mediul de cultură a anumitor regulatori de creștere, sau a unor compuși ale căror efecte dorim să le testăm.

Explante identice ca mărime, dar care provin de la variate specii sau organe, au greutăți diferite și prezintă un număr aleatoriu de celule, ceea ce face ca în vitrocultură, dimensiunile lor legat de o limită critică, să nu fie aceleași, fapt care poate influența – într-o mare măsură – reacția lor la factorii de mediu, din *vitro* sau la cei externi. Dar, în decursul dezvoltării ontogenetice, celulele unui organism, organ sau țesut, variază structural și biochimic, potrivit caracteristicilor lor genetice. Astfel, un explant de mărime limită, format dintr-un țesut liberian, secundar, prelevat din rădăcină de morcov, având greutatea de 3,8 mg, conține aproximativ 25.000 celule; dar, un explant de dimensiune limită, confecționat din tulpini subterane de anghinare, apreciat ca având o masă de 8 mg, deține cca. 20.000 celule; în această situație, dacă la anghinare se reduce masa explantului sub 8 mg, descreşte numărul de celule viabile prezente la nivelul inoculului și, în consecință, se micșorează considerabil șansele de viabilitate ale celulelor țesutului explantat, în condițiile inoculării lui *in vitro*, celulele acestuia fiind într-o prea mare măsură afectate de stresul traumatic (*Street*, 1977 b).

Uneori, relația dintre dimensiunea explantelor și viabilitate depinde și de proveniența lor, respectiv de localizarea topografică a acestora în planta, plantulă sau în organul din care derivă, criteriu care are o importanță majoră și în cazul prelevării de țesuturi dintr-un material biologic juvenil. Astfel, la *Biota*, *Thomas* și colaboratorii (1978) au constatat că fragmente de *hipocotil*, de 1,5 cm lungime, prelevate de la plantule de 4-6 săptămâni, după 2 luni de vitrocultură, au prezentat cea mai ridicată capacitate regenerativă, evaluată la 53%. Pe măsura reducerii dimensiunii fragmentelor de hipocotil de la 1,5 cm la 1 cm și, apoi, la 0,5 cm, s-a observat o descreştere a intensității proceselor de morfogeneză declanșate la nivelul acestora. Amplitudinea fenomenelor regenerative s-a micșorat și pe măsura distanțării punctului de secționare de locul de inserție al cotiledoanelor; astfel, primul fragment – de 0,5 cm – prelevat din imediata vecinătate a cotiledoanelor, a deținut o capacitate regenerativă de 46%; următorul fragment – de 0,5 cm –

situat la 1 cm distanță de baza cotiledoanelor a marcat o activitate regenerativă de numai 19%; la fragmentul succesiv, tot de 0,5 cm, prelevat din zona situată la 1,5 cm de vârful hipocotilului (unde se află locul de inserție al cotiledoanelor), procesele morfogenetice au fost nule. Deci, pe o distanță de numai 2-3 cm, la nivelul aceluiași organ – în cazul de față hipocotil – aflat într-o aceeași fază de dezvoltare ontogenetică, juvenilă, fără modificări morfologice, *in vitro* capacitățile regenerative și cele de morfogeneză au fost calitativ diferite.

3.5.3. Inocularea, incubarea, creșterea dirijată a culturilor, subcultivarea sau repicarea.

Inocularea este operațiunea prin care un material biologic aseptic este amplasat, cu instrumentar lipsit de germeni, în regim axenic,în recipiente dezinfectate, pe/sau într-un substrat de cultură steril, asepsizat prin mijloace fizice sau chimice.

Instrumentele cu care sunt prelevați viitorii inoculi sunt de forme și mărimi variate (de la anze – în microbiologie, la baghete, pense, ace spatulate, bisturie, pipete etc., în biotehnologie). Este important ca instrumentele să poată fi flambate, să nu lezeze inoculul și să fie suficient de lungi pentru a permite accesul cu ușurință a vârfului acestora până la nivelul mediului de cultură. De regulă, inocularea se face cu obiecte metalice, inoxidabile, excepție făcând suspensiile de celule și de protoplaști, caz în care mediile lichide, conținând materialul vegetal care trebuie inoculat, sunt aspirate cu pipete sterile, boante.

Materialul biologic, înaintea inoculării, asepsizat și închis fiind într-o casoletă sau capsule *Petri*, trebuie amplasat în hota cu flux laminar de aer steril (suprafața interioară a acesteia fiind ștearsă cu alcool), împreună cu vasele în care urmează să fie inoculat, în prealabil sterilizate; apoi, hota este pusă în funcțiune și se aprinde becul de gaz sau spirtieră; prin aceste măsuri se realizează o baleiere cu aer aseptic a perimetrului hotei și în acest mod să se îndepărteze eventualii germeni prezenți în aer, sau pe obiectele introduse în hotă.

Inocularea se va face în imediata apropiere a flăcării becului de gaz, sau a spirtierei aprinse, întrucât căldura emanată de flacără antrenează germenii din aer într-un curent ascendent, în susul hotei.

La inoculare, operatorul va flamba – de jur împrejur – mai întâi gâtul recipientului de cultură (mai puțin capsulele *Petri*), și apoi gura acestuia, iar cu mâna în care are instrumentul de inoculare va dezobtura flaconul (dacă acesta este un dop, dopul va fi prins cu degetul mic și imobilizat în palmă),

va întredeschide recipientul cu explante axenice, şi cu pensa sterilă va proceda la prelevarea fragmentului destinat inoculării, şi cu cea mai mare rapiditate şi abilitate va inocula explantul în, sau pe mediul de cultură, scoţând cât mai repede instrumentul din recipient, reflambând gâtul şi gura flaconului, pe care îl va închide cu buşonul trecut prin flacără sau îl va acoperi cu o folie de polietilenă, aseptică. Desfăşurarea inoculării, succesiunea manoperelor, organizarea fiecărei mişcări în parte, viteza de execuţie a acestora, sunt proceduri care vor depinde de îndemânarea şi manualitatea fiecărui operator, de tipul flacoanelor (mărimea, forma, adâncimea şi lărgimea deschiderii), a buşoanelor (forma, mărimea şi constituţia lor), natura substratului de cultură (medii solide, lichide, semisolide, punţi de susţinere etc.) şi a inoculilor. Este important ca pe parcursul inoculării să se prevină degradarea materialului biologic, deshidratarea sau strivirea acestuia, infectarea lui ori a mediilor, orientarea şi amplasarea incorectă a inoculului pe, sau în substratul de cultură (mai ales atunci când trebuie respectată o anumită *orientare polară* a lui), dar şi introducerea prea profundă a acestuia în mediul solidificat sau în cel semisolid, pentru prevenirea intrării ţesuturilor în regim de anaerobioză, şi altele. În cazul în care, într-un acelaşi flacon trebuie introduşi mai mulţi inoculi (situaţie în care vitroculturile se fac într-un vas de capacitate mai mare şi cu deschidere largă), flaconul va rămâne deschis – amplasat fiind în hotă – în imediata vecinătate a flăcării, până sunt executate toate inoculările avute în vedere, şi abia apoi se va flamba deschiderea flaconului, a dopului sau a capacului (de altfel sterile) şi se va proceda la închiderea recipientului de cultură.

La vitroculturile practicate pe medii lichide, inoculii nu ridică probleme în ceea ce priveşte orientarea lor în spaţiu, dar trebuie să se evite prelingerea mediului de cultură în afara recipientelor, în momentul înclinării şi rotirii acestora.

După inoculare, vitroculturile vor fi trecute în camera de creştere, de preferat climatizată, expunându-le la un regim ecofiziologic cerut de natura inoculilor şi de tipul culturilor. În primele zile de cultură, până în momentul declanşării proceselor de creştere, se parcurge o perioadă numită de *incubare*.

În decursul perioadei de *incubare* se urmăreşte apariţia *infecţiilor* la nivelul vitroculturilor, procedându-se la înlăturarea acestora şi a culturilor necrozate. Microorganisme întâlnite în vitroculturile vegetale (după *Cole, 1996*) sunt de tip *bacterian*, dintre bacteriile *Gram pozitive* amintim: *Actinomyces*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Clavibacter*, *Arthrobacter*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Rhodococcus* şi *Curtobacterium*, iar din-

tre bacteriile *Gram negative* menţionăm genurile: *Pseudomonas*, *Erwinia*; *Xanthomonas*; *Methylobacterium*, *Acinotobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*; *Agrobacterium*, precum şi de tip *fungic*, dintre acestea enumerăm: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*; *Trichoderma*, *Candida*, *Botrytis*; *Fusarium*, *Epicoccum*, *Rhodotorula*, *Mucor* şi *Rhizopus*.

Vitroculturile infectate sunt ratate şi respectivele recipiente trebuie debarasate, lavate şi sterilizate. Pentru a micşora riscul de contaminare a atmosferei din unitate, respectiv din laboratoare, este recomandabil ca flacoanele infectate să fie întâi sterilizate, prin autoclavare şi abia apoi debuşonate şi spălate, operaţie care ridică costurile de producţie, mai ales cu un plus de consum energetic.

În momentul examinării şi a trierii culturilor, la sfârşitul perioadei de incubare, este recomandabilă subcultivarea explantelor care prezintă, la bază, o brunificare a mediilor de cultură (semn de oxidare a unor fenoli eliminaţi de celulele inoculate, mai ales la explantele provenite din specii lemnoase, fenoli ce se constituie în "bariere" chimice care stânjenesc sau împiedică schimburile inoculului cu şi substratul); subcultivarea se va face pe medii proaspete, care conţin antioxidanţi; la reinoculare se vor îndepărta ţesuturile brunificate, măsură prin care, în astfel de cazuri, procesele regenerative – încetinite sau stopate – pot fi reamorsate.

De regulă, în aproximativ una sau două săptămâni de la inoculare, la vitroculturile de plante ierboase, vor putea fi observate manifestări ale primelor procese regenerative. La explantele prelevate de la plante lemnoase, procesele proliferative sunt mult mai lente, chiar dacă ele deţin meristeme secundare, manifestarea acestora exteriorizându-se abia după aproximativ 45-60 de zile de la inoculare.

Creşterea propriu-zisă a culturilor începe odată cu apariţia primelor semne vizibile de iniţiere a proceselor regenerative, perioadă variabilă ca durată în funcţie de specie, de natura explantelor, compoziţia mediilor de cultură, condiţiile din camera de creştere, tipul culturilor etc. Iluminarea vitroculturilor, după indicaţiile din literatura de specialitate, este recomandat să fie făcută cu lumina albă, emisă de tuburi fluorescente, cu o gamă variată de intensitate, în funcţie de cerinţe, cuprinsă între 500-5000 lucşi, respectiv între 0,2-2 $W.m^{-2}$; mai rar este indicată ridicarea intensităţii luminoase la valori de 4 $W.m^{-2}$ (după *Zrýd* şi colab., 1988). Dirijarea creşterii şi a evoluţiei culturilor se concepe în momentul preparării mediilor de cultură, a tipului de vitrocultură, în funcţie de scopul urmărit şi de condiţiile ecofiziologice. Uneori, se mai poate interveni pe parcursul vitroculturii, prin injectarea în recipiente a unor soluţii aseptice, realizându-se o hidratare suplimentară a

inoculilor, sau prin adaos de soluție de zaharoză sau de regulatori de creștere, obținându-se astfel așa numitele *culturi* în *dublu strat* (bistratificate sau în dublă fază, la bază aflându-se mediu agarizat, acoperind fiind cu un supernatant, mediu lichid de compoziție dorită) (*Cachiță*, 1983; *Viseur*, 1987). Această tehnică a fost extinsă la Gembloux, pentru multiplicarea părului (*Boxus* și colab., 1995).

Procesele regenerative încep fie cu *multiplicarea* celulară, atunci când inoculii dețin celule apte de mitoză, fie cu *dediferențierea*, în situația în care cormofitoinoculii nu au meristeme, ci sunt constituiți numai din celule definitivate morfofiziologic, ori demarează cu ambele procese, ce se petrec în diferitele zone ale inoculului, în variate momente ale restituției regenerative. Mitozele, în celulele diferențiate, se vor produce numai după dediferențierea a o parte dintre celulele care nu au fost prea profund diferențiate. După diviziune (fie ele celule solitare – cultivate în suspensii celulare sau ca celule imobilizate – fie celule calusale, fie aflate în diferite structuri tisulare), celulele neoformate *in vitro* vor *crește*, se vor diferenția, sau nu, și, după caz, vor da naștere la variate morfostructuri, constituind organele viitoarelor vitroplantule, sau vor forma embrioni somatici.

Din explantele meristematice, apicale sau axilare, precum și din apexurile caulinare ori din muguri, postinoculare se vor regenera – relativ repede – tulpinițe (lăstari), la baza cărora se vor neoforma rădăcinițe adventive, luând astfel naștere, în scurt timp, vitroplantule complet conformate, fenomen asemănător proceselor ce se petrec în înmulțirea vegetativă prin butași. Morfogeneza sau calogeneza (cu, ori lipsită de organogeneză), pe parcursul întregii perioadei de vitrocultură, la nivelul meristemelor rezultate din celulele dediferențiate sau al meristemelor interne, prezente în explantele de tip *nod*, *internod*, *limb*, *inflorescențe*, *pețiol*, *rahis*, *boboci*, *muguri* etc., inoculate *in vitro* pe diferite medii de bază care conțin citochinine se manifestă mai lent, prin procese regenerative, în timp, neoformându-se mugurași; pe medii de cultură exclusiv cu auxine, o aceeași categorie de explante pot genera calus și rădăcinițe, iar pe medii care conțin ambele tipuri de regulatori de creștere, administrați în concentrații ridicate, pot forma calus; pe medii de bază cu concentrații scăzute de auxină/citochinină, în raport de 1/1, se stimulează formarea concomitentă de tulpinițe și de rădăcinițe. În situații particulare, în funcție de natura inoculului – cu precădere în prezența citochininei tidiazuron – pot fi generați embrionii somatici. În lipsa regulatorilor de creștere, aceste tipuri de explante – de cele mai multe ori – se necrozează, reacția lor fiind cu totul diferită de aceea a explantelor meristematice, apicale sau axilare, care – în funcție de specie –

chiar și pe medii lipsite de regulatori de creștere, pot regenera vitroplantule, inoculii comportându-se ca mini- sau microbutași.

Originea mugurașilor neoformați la nivelul diferitelor categorii de inoculi este încă neelucidată (*Hicks*, 1994). Neogeneza de mugurași își are originea în *meristemoizi*. Localizarea formațiunilor promeristemoide nu este prea clară. La cotiledoanele de pin s-a constatat că, în stratul subepidermal există unele celule care – pe medii de bază bogate în citochinine – se divid repetat și dau naștere la patru celule, ce devin precursoare ale unui meristemoid, din care poate rezulta, ulterior, un mugureș. Formațiuni meristemoide, la angiosperme, se pot forma și din celule epidermale, mezofiliene, din țesut parenchimatos (după *Flinn* și colab., 1988; *Ross* și colab., 1973), sau din celule floemice (*Julliard* și colab., 1992; *Pieron*, 1995).

Antigiberelinele *acimidol* (2-4 μM) și *paclobutazol* (3,5-8,5 μM) sunt utilizate în vitrocultură pentru împiedicarea dezvoltării internodiilor, de exemplu la tulpinile de sparanghel (*Boxus*, 1992) ori la gladiole (*Ziv*, 1990), inducându-se astfel dezvoltarea unei mase compacte de mugurași.

În momentul în care din mugurași cresc tulpinițe, pentru obținerea de plante, respectiv pentru regenerarea la nivelul acestora de rădăcinițe, se impune operarea unor *subculturi*, de pasare, respectiv de repicarea sau *transferarea* acestora, ori a propagulilor, pe variate tipuri de medii de bază proaspete, uneori lipsite de regulatori de creștere, sau având doar un adaos de auxine. *Separarea* și pasarea culturilor pe medii proaspete, respectiv *repicarea* acestora, se poate face fie pe un mediu de cultură identic cu cel de pe care derivă culturile, fie – atunci când se urmărește obținerea unei rate ridicate de multiplicare clonală a unei culturi sau a unui anumit subiect – transferul se va face pe medii cu excedent de citochinină. În general, materialul biologic potrivit pentru multiplicare clonală trebuie să fie tânăr.

În cazul în care din explante s-a regenerat *calus* și dacă prin subcultură, în continuare, se urmărește menținerea culturii de calus, acesta trebuie repicat periodic, prin fragmentarea și trecerea lui pe un mediu proaspăt, cu adaos de auxină – ca unic regulator de creștere – de exemplu de 2,4-D, în concentrație de peste 1 mg/l (până la 10 mg/l), sau o altă auxină, de preferință din clasa respectivă; dacă, dimpotrivă, se urmărește inducerea și susținerea proceselor de morfogeneză, respectiv formarea la nivelul calusului de mugurași și de tulpinițe, cu izolarea de somaclone, sau formarea de embrioni somatici, subcultivarea calusului se va face pe medii cu excedent de citochinine, lipsite de 2,4-D. Dacă însă se urmărește inițierea unor culturi de celule, subcultura de calus – cu precădere friabil – se va opera pe medii lichide, agitate, prin dispersarea acestuia rezultând suspensii celulare. Apoi,

suspensiile celulare vor fi decantate şi supernatantul va fi subcultivat repetat; frecventele operaţiuni de subcultură sunt menite să păstreze "statutul juvenil" al celulelor aflate în cultură. În caz contrar, celulele – după circa 20-30 de zile de vitrocultură – pot intra în senescenţă (pentru detalii vezi capitolul 5 rezultând suspensii celulare din prezentul tratat). Atunci când din culturile de celule se doreşte iniţierea de calus, subcultivarea unei mici cantităţi din mediul de cultură se va face pe un mediu agarizat, aspirându-se într-o pipetă sterilă, boantă, o mică cantitate din suspensia de celule, lichid pe care apoi îl dispersăm şi îl etalăm, cât mai uniform, pe o placă de mediu aseptic, agarizat. Tehnica permite, ulterior, izolarea de linii celulare, întrucât celulele solitare – unele dintre ele individualizate pe suprafaţa plăcii agarizate – vor genera microcalusuri (fig. 33A-D), din care se vor regenera calusuri repicabile, iar la nivelul calusurilor vor putea fi induse procese de organogeneză, cu neoformarea de vitroplantule.

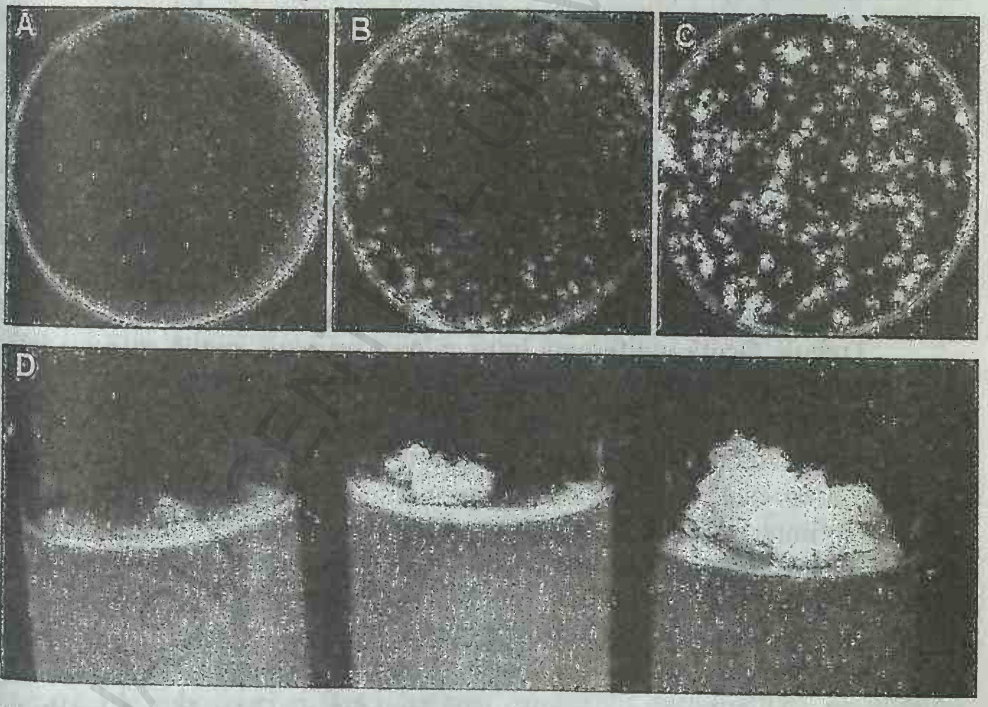


Fig. 33. Etape în regenerarea de calus dintr-o cultură de celule, prin etalarea acestora pe o placă agarizată (A – celule etalate în faza iniţială; B – fază intermediară de multiplicare a celulelor, cu formare de noduli calusali; C – faza finală de constituire a maselor de calus generate – fiecare în parte – din clonarea celulelor etalate; D – subcultura individuală a fiecărui calus regenerat din câte o celulă în urma etalării suspensiei celulare)

În culturile de *rădăcini*, subcultivarea se operează prin prelevarea periodică a apexurilor radiculare şi reinocularea lor pe medii lichide, proaspete; altfel, cultura îmbătrâneşte şi moare.

Apariția la nivelul inoculilor a proceselor de *senescență* se datorează, probabil, nu numai vechimii culturilor, ci şi a apariției în mediul de cultură a unor carențe, în primul rând în anumite elemente chimice, cu producerea unor dezechilibre ionice (intervenite în urma absorbirii selective a ionilor de către celulele inoculilor), sau a sărăcirii mediului în glucide, ori din cauza alterării unora dintre propietățile fizico-chimice ale mediilor de cultură, în urma desicării în timp a acestora, ceea ce provoacă şi o creştere a concentrației lor saline, sau în urma desorbirii în medii de compuşi fitotoxici, de către unii inoculi, compuşi care limitează creşterea normală a cormofitoinoculilor, ori se produce o însumare a unora dintre aceste efecte. Cert este faptul că, la un moment dat, operația de subcultivare devine o necesitate stringentă. În caz contrar, treptat, inoculul moare, fie că el se află în cultură primară, fie în subcultură. Alegerea momentului în care cultura trebuia repicată depinde de gradul de dezvoltare al cormofitoinoculilor, proces în care o pondere mare o are componenta genetică, tipul de cultură, natura şi mărimea inoculului, condițiile din camera de creştere şi, nu în ultimul rând, compoziția chimică a substratului de cultură. Dacă se urmăreşte o continuitate în timp a unei vitroculturi, repicarea periodică a cormofitoinoculilor se impune, mai curând sau mai târziu din momentul inițierii culturii, în funcție de scopul urmărit, de tipul culturii, mediul folosit şi particularitățile de reacție ale inoculilor.

Trebuie făcută o diferență între *cultura primară*, cea în care s-a înființat cultura aseptică, şi culturile succesive, *subculturi* ale căror rol poate fi variat, în dependență de ceea ce se urmăreşte a se obține din ele, în final. În subculturi, dezvoltarea inoculilor va purta "amprenta" culturii primare. Această "amprentă", în funcție de *natura* țesuturilor şi a celulelor care au servit la înființarea sau la inițierea culturii, *compoziția mediilor* (cu precădere a balanței hormonale), *condițiile* de cultură şi *genotipul*, vor fi resimțite în treptele de subcultură, imprimând vitroculturilor particularități de reacție. În urma unor subculturi repetate, competențele, respectiv aptitudinile celulelor unor culturi pot să se "stingă", pierzându-se sau atenuându-se ca intensitate, în decursul repicărilor succesive, situație întâlnită mai ales în cazul culturilor de calus, când se poate remarca, uneori, o descreştere a capacității embriogene sau organogene a acestora, ori a aptitudinii celulelor de a sintetiza – cantitativ sau calitativ – aceeaşi compuşi specifici, caracteristici metabolismului secundar, manifestări care, până în momentul de față, sunt explicate în insuficientă măsură. Pentru elucidarea perturbațiilor fiziologice şi meta-

bolice care conduc la producerea unor astfel de fenomene, este necesară efectuarea de studii fundamentale, complexe.

Uneori repicarea se impune a fi executată la scurt timp după administrarea unor tratamente, cum ar fi cele de *stresselecție*, sau în urma iradierii culturilor cu radiații ionizante (caz în care producerea de radicali liberi în mediul de cultură poate provoca pierderea vitalității celulare), ori – în cazul administrării unor *crioprotectori* în substratul de cultură (a căror durată de acțiune, de regulă, este limitată, tratamentul fiind admis numai pentru o perioadă scurtă de timp, prealabil înghețării culturilor), sau a aplicării unor agenți *mutageni*.

Dacă repicarea culturilor nu s-a făcut la timp, inoculii aflați de mai multă vreme în cultură manifestă o schimbare a culorii (de exemplu calusul devine cenușiu sau brun) sau se usucă, ori frunzulițele bazale – prezente pe tulpinițele (lăstarii) neoformate la nivelul culturilor – se îngălbenesc, sau culturile de celule își măresc vâscozitatea, spumează și își modifică culoarea. Fenomenele menționate se constituie în semnale ale intrării vitroculturilor într-un proces de degenerescență.

În cazul în care dorim să păstrăm în "*stoc*" o anumită vitrocultură, în regim special de creștere lentă, subcultivarea se va opera la intervale lungi de timp (din 6 în 6 luni, ori anual, sau chiar mai rar), în astfel de situații practicându-se diferite metode de *reducere a intensității de desfășurare a proceselor* vitale, fie prin hipoxie, fie prin acoperirea culturii cu un strat aseptic, izolator, uleios, de ulei de parafină sau de silicagel, fie menținând vitroculturile la temperaturi pozitive, coborâte (4-7°C), în regim de iluminare slabă, fie la temperaturi negative, caz în care este obligatorie adoptarea unor măsuri speciale de crioprotecție, mai ales atunci când culturile sunt stocate, pe timp nelimitat, la temperatura azotului lichid, de -196°C (vezi subcapitolul următor).

În cazul embrionilor somatici, problemele legate de dirijarea evoluției culturilor sunt mai complicate. Pentru asigurarea uniformității morfofiziologice a stadiului de dezvoltare al embrionilor și a sincronizării statutului fiziologic al acestora, precum și pentru intrarea lor în latență (în repaus germinal, formă sub care ei pot fi păstrați un timp mai îndelungat, fără operarea de subculturi și fără afectarea capacității germinative), se impune luarea unor măsuri speciale, în ceea ce privește mediile de cultură și regulatorii de creștere, optime reglării procesului de embriogeneză. Relații referitoare la aceste probleme vor fi date într-un capitol care face parte din volumul 2 al prezentului *Tratat de biotehnologie vegetală*.

3.5.4. Vitroconservarea

Conservarea unui material vegetal aflat în *vitrocultură* se referă la o *reducere* sau *stopare* temporară a proceselor vitale, la nivelul celulelor inoculilor, cu menținerea șanselor de a readuce – după dorință – culturile respective la viață activă, normală, cu regenerarea de celule, țesuturi, organe, respectiv a genotipului conservat, fără pierderea capacităților morfofiziologice și biochimice ale cormofitoinoculilor stocați în regim de conservare, pe o durată mai scurtă sau mai lungă de timp.

Conservarea cormofitoinoculilor se practică prin proceduri variate, fie prin menținerea vitroculturilor în regim de *creștere lentă*, fie prin *crioconservare* (*Cachiță*, 1987; *Halmagyi*, 2000).

În toate cazurile, se are în vedere protejarea și menținerea integrală, sau în cea mai mare parte, a viabilității celulelor și țesuturilor crioconservate, a capacității lor regenerative, organoformatoare și embriogene, dar și a celor de sintetizare a unor produși secundari de metabolism, de interes pentru bioindustrii.

Vitroconservarea servește unor *scopuri* variate, fie pentru menținerea în *stoc* a unor vitroculturi cu caracteristici valoroase, cunoscute și prețuite în laboratoarele de micropropagare, ca și "cap" de clone în înmulțirea clonală (de mai mică sau mai mare anvergură), ori ca material liber de viroze, fie ca material inițial, utilizat în unitățile de cercetare, ori în biotestări, în experimente de genetică sau de ameliorare, pentru păstrarea unor mutante valoroase, a unor linii celulare ori a unor calusuri, cu calități morfogene sau biogene speciale, ș.a.m.d. De dată mai recentă, vitroconservarea vizează și stocarea în bănci de germoplasmă a unor resurse naturale, provenite din flora spontană.

O *temporizare* mai moderată a proceselor vitale, la nivelul cormofitoinoculilor, se poate realiza prin procedee diverse, care au în vedere fie o *diminuare a aportului de oxigen*, la celulele inoculate *in vitro*, fie o legare mai puternică a apei libere, în mediile gelificate, fie *coborârea temperaturii* și a gradului de *iluminare* în perimetrele unde se află amplasate și stocate vitrocolecțiile (temperaturi coborâte, dar pozitive), fie introducerea vitroculturilor în regim de *frig profund*, pentru conservare de lungă durată, procedură care presupune *imersarea* vitroculturilor în azot lichid (-196^{0}C), după o prealabilă pregătire a inoculilor prin administrarea de tratamente cu variați agenți crioprotectori, de tipul dimetilsulfoxidului (DMSO), a glicerolului, a polietilenglicolului (PEG) etc., administrați în scopul deshidratării menajate, fiziologice, gradate, a celulelor, reducându-se la minimum (la limita de jos a supraviețuirii) apa congelabilă, nelegată în biostructuri.

Diminuarea intensității proceselor biologice în cormofitoinoculi, se poate obține și prin coborârea presiunii atmosferice în recipientele de cultură – metoda *hipobarică* – reducându-se presiunea parțială a tuturor gazelor care intră în compoziția aerului din flacoanele de cultură supuse acestei proceduri. Rata de creștere a calusului (la crizanteme, tutun sau la tomate) a putut fi diminuată de patru ori, prin coborârea presiunii atmosferice în recipiente la 40 mmHg, iar a presiunii oxigenului la 7,6 mmHg (din *Bridgen* și colab., 1978). Alte metode, vizează o scădere – mai mult sau mai puțin severă – a concentrației oxigenului din atmosfera recipientelor de cultură și înlocuirea lui cu azot (gaz inert), creându-se astfel un regim de *hipoxie* (vezi *Cachiță*, 1987). Alteori, se mărește aportul de CO_2 în recipientele de cultură, generându-se un excedent, fapt care exercită o represie a *proceselor de respirație*.

În categoria vitroculturilor cu creștere lentă intră și conservarea resurselor de germoplasmă sub un *strat de ulei* de parafină, principiul metodei constând fie în menținerea cormofitoinoculilor în regimul normal din camera de creștere, fie trecerea lor în regim de temperaturi coborâte, dar pozitive, la lumină sau la întuneric, acoperite fiind de un strat de ulei de parafină aseptică (fig. 34). Prin această procedură se rărește foarte mult intervalul de subcultură, fără a afecta calitățile inoculilor (vezi *Cachiță* și *Halmágy*, 1999). Metoda poate fi utilizată cu succes la variate tipuri de vitroculturi vegetale (culturi de: meristeme, apexuri, calus, plantule), mărindu-se – până la doi ani – intervalul de subcultură.

O altă metodă de temporizare a creșterii cormofitoinoculilor, cu o micșorare a intensității reacțiilor metabolice, este aceea a *deshidratării menajate* a celulelor vitroculturilor, proces fiziologic asemănător celui petrecut în mod natural, în timpul coacerii semințelor, al maturării polenului, sporilor, a unor fructe și organe de rezervă, ori a ramurilor și mugurilor, pregătite astfel să reziste intemperiilor naturale (frig, uscăciune, căldură).

Nitzsche (1983) a *deshidratat* calus de morcov și de cartof, timp de 36 ore, în hota cu flux laminar de aer steril, pe care la menținut ca atare *in vitro*, timp de doi ani, la o temperatură de 15^0C (în atmosferă cu 25% umiditate), fără subcultură. În momentul trecerii calusului pe un mediu proaspăt, în condiții ambientale optime, creșterea acestuia a fost reluată. Tot *Nitzsche* (1983) a constatat că o importanță deosebită – în astfel de experimente – o are compoziția mediului de cultură, respectiv introducerea în substratul de cultură a 0,15 M zaharoză, împreună cu 37,8 μM acid abscisic, calusul deshidratat de morcov și de cartof rezistând, în timp, la o criostocare la -80^0C.

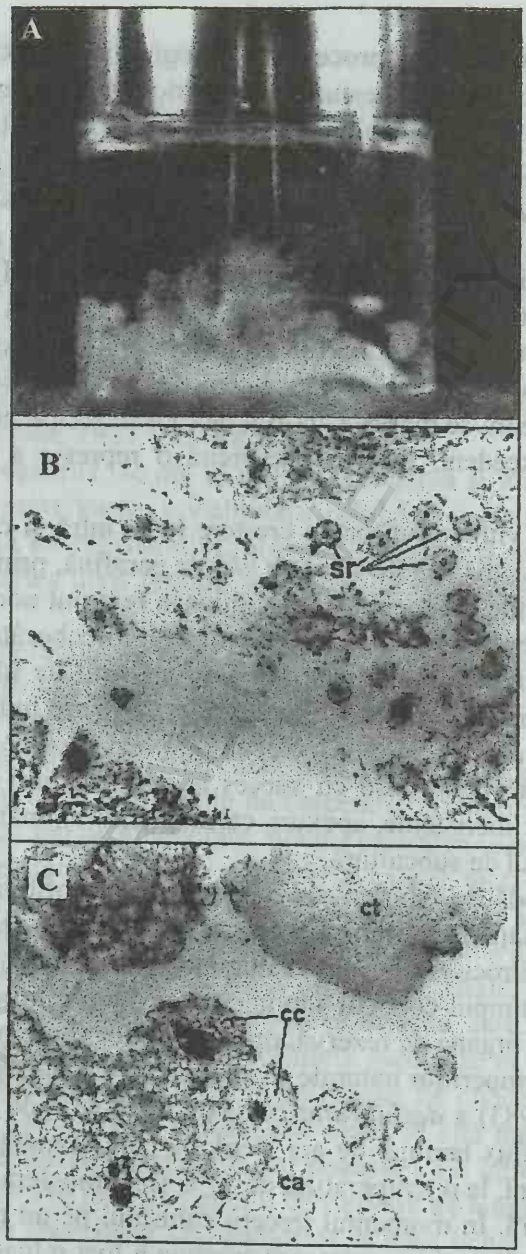


Fig. 34. Temporizarea creşterii vitroculturilor prin acoperirea acestora cu un strat aseptic de ulei de parafină (A – cultură de calus cu o vechime de doi ani, fără operarea de subculturi, cu rizogeneză şi caulogeneză; B – secțiuni transversale prin masa de calus, cu vizualizarea de secțiuni transversale prin rădăcinițe (sr); C – calus, unde: ct = calus tânăr; ca = calus adult; cc = centri caulogeni)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Scoaterea apei din celule se poate face şi printr-o *creştere* a *presiunii osmotice* a substratului de cultură, adăugându-se în acesta o cantitate suplimentară de zaharoză, sorbitol şi manitol (substanţe osmotic active), fapt care conduce, în celule, la o exosmoză şi la o scădere a nivelului schimburilor dintre acestea şi mediul exterior, încetinindu-se procesele vitale.

Ultima operaţiune, cea mai edificatoare – în ceea ce priveşte reuşita conservării prin oricare procedură de stocare a vitroculturilor, este aceea a analizării reacţiei cormofitoinoculilor, după scoaterea culturilor din regimul de stocare şi *subcultivarea* lor pe medii proaspete, adecvate ca şi compoziţie chimică susţinerii proceselor regenerative, cu sau fără spălarea inoculilor, prealabil subcultivării acestora, după caz, cu sau fără repicare, precum şi efectuarea de teste de vitalitate celulară, cu soluţie de clorură de trifeniltetrazoliu (CTT) ori cu diacetat de fluoresceină.

Prin metodele de vitroconservare a cormofitoinoculilor se realizează nu numai o mărire a intervalului de subcultură şi "salvarea" unor specii ori "linii" periclitate cu dispariţia, ci şi efectuarea, cu o mai mare facilitate, a schimburilor internaţionale de germoplasmă (pentru detalii vezi *Cachiţă*, 1987 şi subcapitolul de *vitroconservare* ce va fi publicat în volumul 2 al *Tratatului de biotehnologie vegetală*).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.6. TRANSFERAREA VITROPLANTULELOR *EX VITRO* ȘI ACLIMATIZAREA LOR LA MEDIUL SEPTIC DE VIAȚĂ

În cadrul operațiunilor cuprinse în programele unităților profilate pe vitroculturi vegetale, cu excepția acelora care *valorifică vitrobiomasa* în bioindustrii, intră și etapa situată la finele lanțului de micropropagare *in vitro* a plantelor, aceea de *aclimatizare* a vitroplantulelor generate în regim aseptic la condițiile de viață din mediu septic, procedură care constă în transferarea *ex vitro* a acestora, chiar dacă au sau nu rădăcinițe. În această categorie se încadrează – în primul rând – *vitroplantulele* înrădăcinate (fig. 35A-G) și – în al doilea rând – formațiunile caulinare neînrădăcinate, cum sunt *propagulii* rezultați prin separare de tufe (de exemplu de conopidă – fig. 36B și C – de gerbera – fig. 37A-D, sau de violete africane, de sfeclă etc.), și tulpinițele regenerate la nivelul variatelor categorii de cormofitoinoculi (cum sunt lăstarii neoformați la suprafața calusurilor fig. 38C-D, sau în interiorul bobocilor cultivați *in vitro* fig. 38E), formațiuni care sunt tratate ca butașii ce pot fi înrădăcinați *in vitro*, sau *ex vitro*, în substrat inert (perlită, nisip etc.), sterilizat în prealabil, aplicând la baza acestora pudre rizogene (preparate cu auxină), utilizate, de regulă pentru înrădăcinarea butașilor de plante ierboase.

În momentul trecerii vitroplantulelor, ori a minibutașilor sau a propagulilor din *vitro*, *ex vitro*, precum și în săptămânile următoare, acestea suferă un șoc, deoarece în perioada de vitrocultură ele au beneficiat de un regim ecofiziologic special, și anume: mediu septic, substrat artificial de cultură, ce are o umiditate ridicată și care – cu excepția culturilor de tip fotoautotrof – asigură cormofitoinoculilor, chiar dacă sunt verzi, un regim metabolic *heterotrof* sau *mixotrof*, un mediu cu un conținut ridicat în ioni anorganici și în zahăr, respectiv cu nivel osmotic mărit, o atmosferă staționară, bogată în etilenă și cu un deficit în O_2 și în CO_2, o iluminare slabă (sub nivelul luminii de care dispun plantele crescute în natură sau în spații protejate), mediu de cultură cu regulatori de creștere și vitamine, tablou care, în ansamblul lui, face ca vitroplantulele să prezinte anumite modificări morfofiziologice caracteristice, cum ar fi: - transpirație excesivă (din cauza slabei dezvoltări a cuticulei epidermale); - densitate stomatică scăzută, stomate cu morfologie modificată și cu funcționarea deficitară a celulelor, osteolele lor fiind în permanență deschise; - rată fotosintetică extrem de scăzută și autotrofie incompletă, din cauza țesutului palisadic redus, a mezofilului foliar ce constă

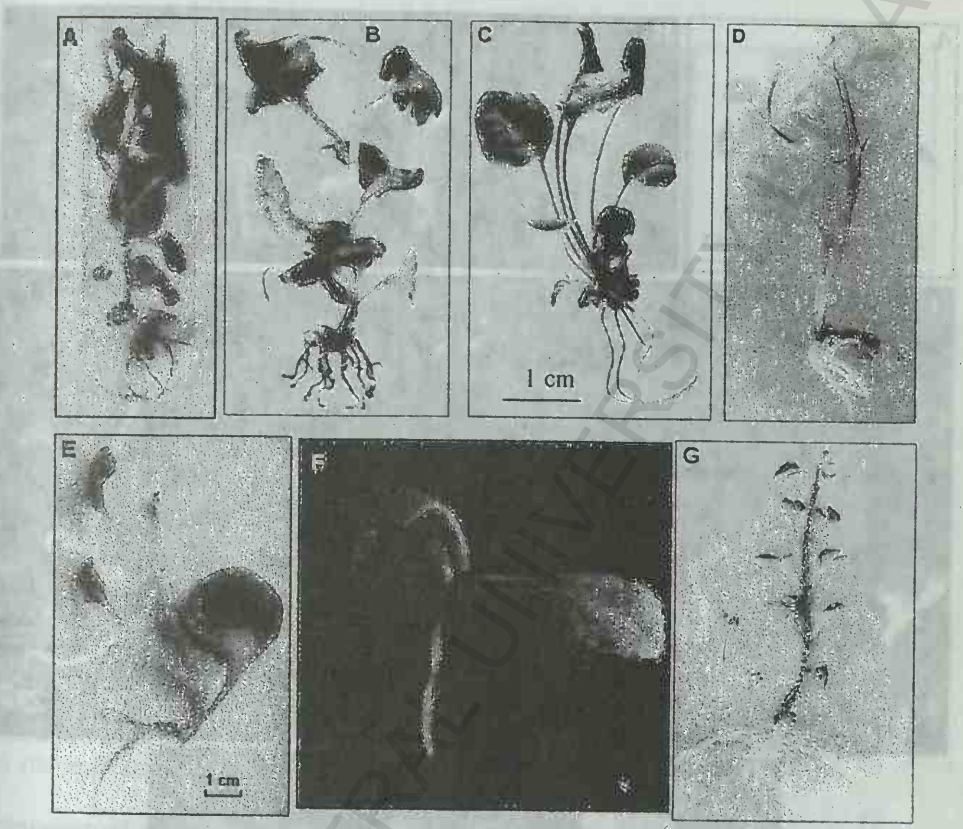


Fig. 35. Vitroplantule cu rizogeneză, apte de transferare *ex vitro* (A şi B plantule de crizanteme; C – F *propaguli*: C = gerbera, D = freesia, E = sfeclă, F = conopidă; G – plantulă de *Exacum*)

dintr-un unic strat de celule, în loc de 2-3 straturi, număr mic de cloroplaste, cu depuneri de amidon şi conţinut diminuat în clorofilă; - dificultate în diferenţierea ţesuturilor; - înrădăcinare deficitară şi incompletă (iar atunci când rădăcinile sunt prezente, neavând perişori absorbanţi, acestea au o capacitate scăzută de aprovizionare a vitroplantulelor cu apă şi nutrienţi); - dezordini fiziologice cauzate de hiperhidrie, respectiv vitrificarea vitroculturilor, fenomen provocat – în principal – de acumularea de etilenă în recipiente; - existenţa pericolului potenţial al apariţiei de infecţii, fapt care menţine, în permanenţă, riscul compromiterii şi pierderii culturilor; - modificarea – într-un timp relativ scurt – a echilibrului ecofiziologic din vasele cu cormofitoinoculi, prin creşterea în timp a masei biologice, ceea ce determină producerea unor dezechilibre ale raporturilor ionice (ca natură şi concentraţie); – risc de apariţie – într-un procent ridicat – a mutaţiilor etc. Acest

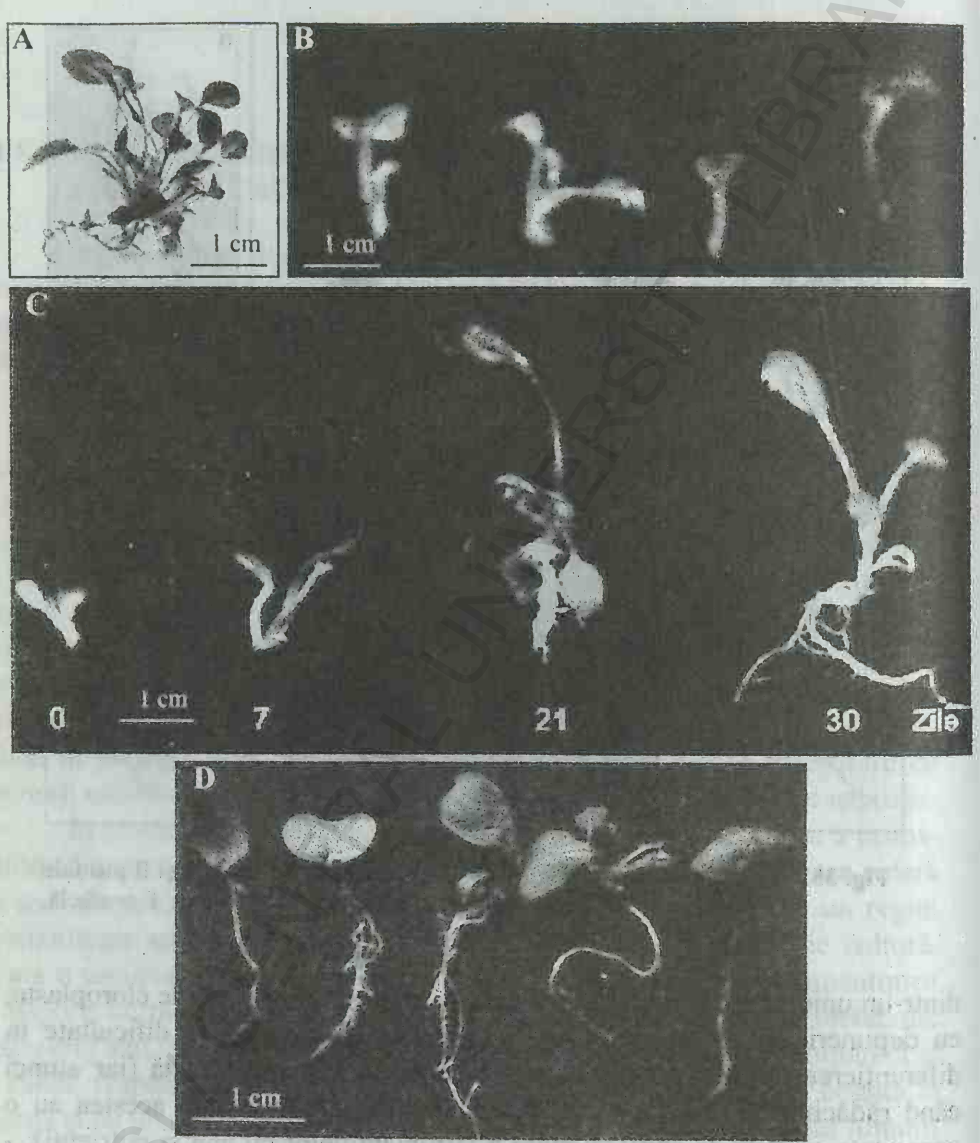


Fig. 36. Propaguli (A-C) și minibutași foliari (D) de *conopidă* înrădăcinați *in vitro*. A = tufă neoformată pe mediu cu 2 mg/l BA; B = propaguli și minibutași foliari separați din tufa A; înrădăcinarea *in vitro* a propagulilor (C) și a minibutașilor foliari, pe medii de bază MS cu 0,1 mg/l ANA (D)

tablou complex face ca, în momentul scoaterii vitroplantulelor din regimul de vitrocultură acestea, cel puțin pentru o perioadă de timp, să necesite o protecție împotriva "vitregiei" condițiilor prezente în mediul natural, cum ar fi: grad redus de hidratare, nutriție autotrofă (fotosintetică), curenți de aer,

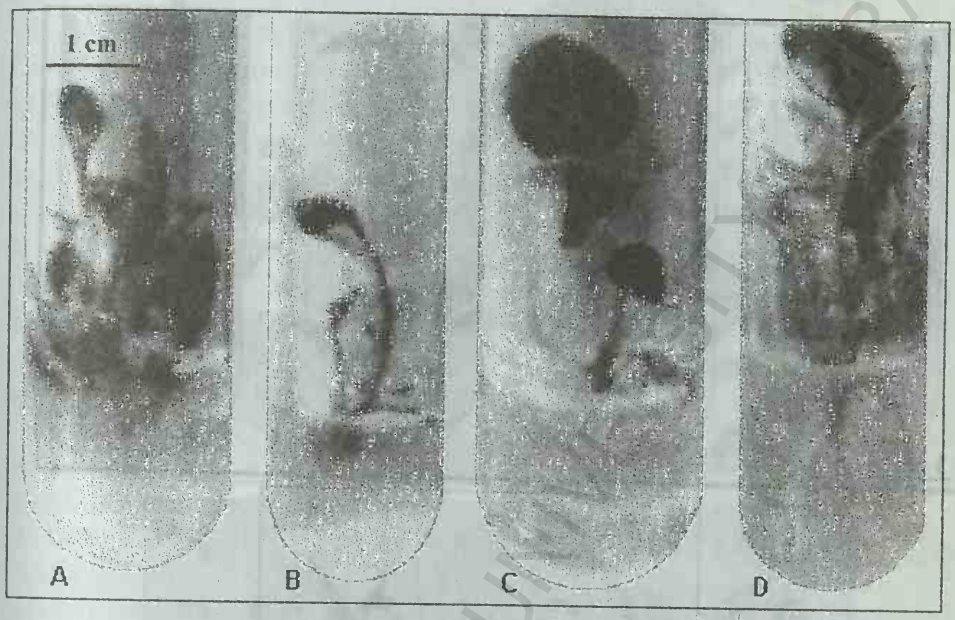


Fig. 37. Înrădăcinarea *in vitro* a propagulilor de gerbera. **A** = tufă de propaguli generată pe medii cu 5 mg/l BA; **B** = propagul izolat din tufa de propaguli şi pus la înrădăcinat pe mediu de bază cu 1 mg/l ANA; **C – D** = creşterea propagulului şi rizogeneza realizată după 55 zile de la inoculare

temperatură şi iluminare mai crescută, pericol de infecţii etc. Pentru supravieţuirea acestora, în momentul trecerii lor în mediul septic, trebuie atenuat şocul de transfer, după plantarea ex vitroplantulelor într-un substrat adecvat de cultură, astfel încât stresul să nu le producă moartea, ci prin măsurile care se iau să se asigure condiţiile minime necesare susţinerii acomodării vitroplantulelor la mediul natural de viaţă, perioadă în care în corpul lor se petrec o serie de transformări morfofiziologice, adaptative, care urmează să permită celulelor preluarea funcţiilor vitale normale, în mediul natural de viaţă. Aceste modificări privesc, în primul rând, luarea unor măsuri de reducere a evapotranspiraţiei, cu atât mai mult cu cât vitroplantulele prezintă dificultăţi în ceea ce priveşte aprovizionarea lor cu apă, din cauza sistemului radicular precar dezvoltat. În lipsa unor măsuri de împiedicare a deshidratării excesive a vitroplantulelor transferate *ex vitro*, la nivelul acestora se instalează un rapid şi periculos deficit hidric; pe de altă parte, proaspăt ex vitroplantulele manifestă o slabă capacitate de nutriţie şi de apărare, un metabolism perturbat şi o temporară imposibilitate de creştere şi de fotosinteză. În urma unor studii de microscopie electronică (*Cachiţă*, 1987), s-a constatat prezen-

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

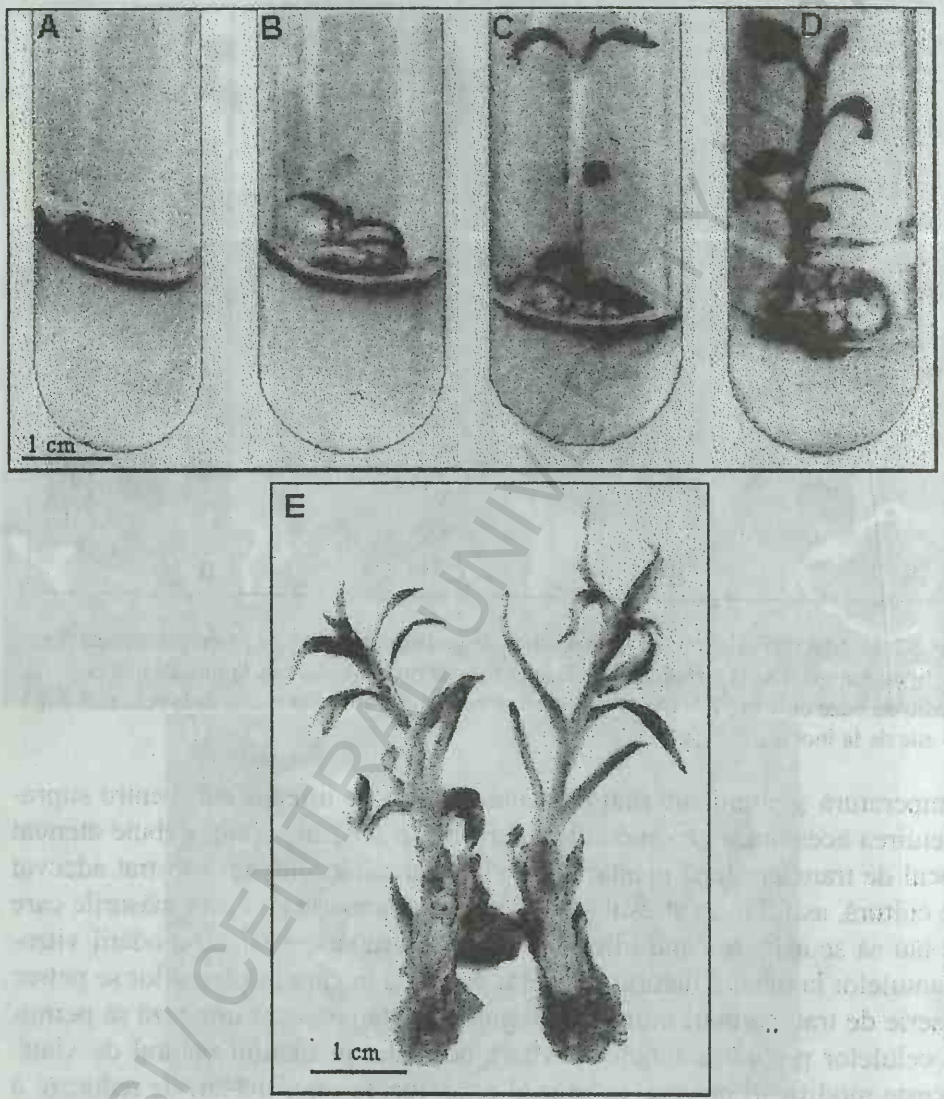


Fig. 38. Tulpinițe regenerate la nivelul calusului de *crizanteme* (A-D) sau în interiorul bobocului de *garoafe* (E), ce pot fi detașate de inocul și înrădăcinate *in vitro* sau *ex vitro*

ța, la 24 ore de la transferarea *ex vitro* a plantulelor de garoafe în stroma cloroplastelor din mezofilul foliar al frunzulițelor (fig. 39B), a numeroase canalicule neelectrondense, care ar putea semnifica existența în ele a unui

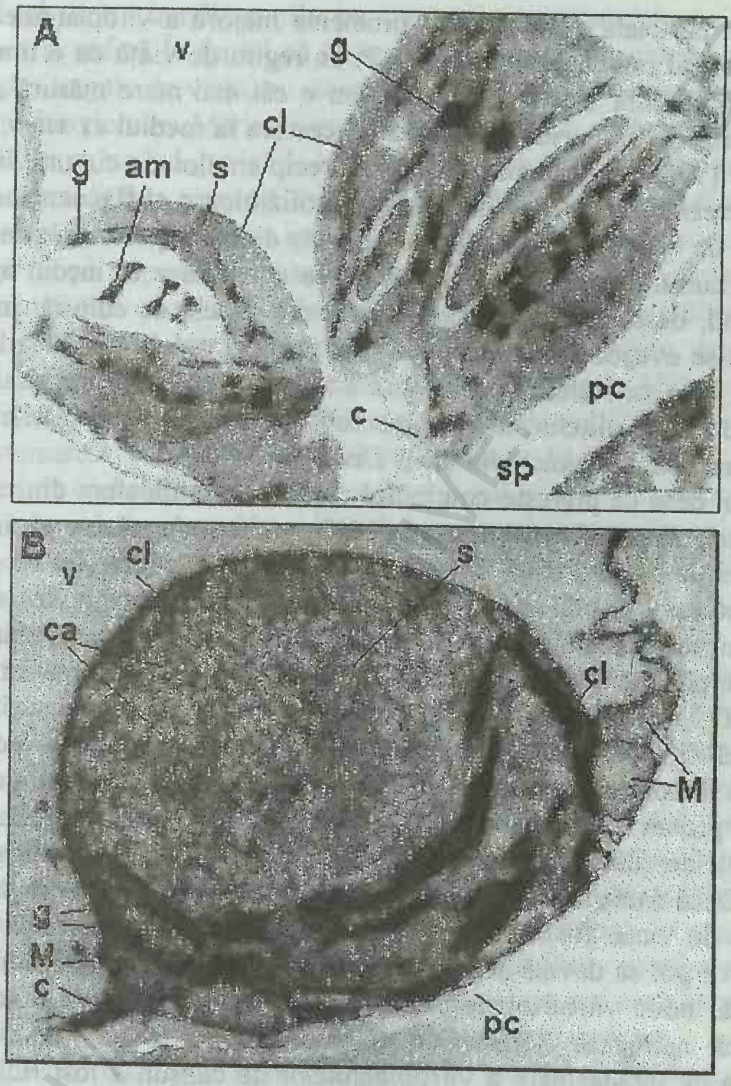


Fig. 39. Aspectul ultrastructural al cloroplastelor din celulele mezofiliene ale frunzulițelor plantulelor de garoafe (A = cloroplaste la plantule aflate *in vitro*: 6000x; B = cloroplast în mezofilul frunzuliței plantulei, după 24 h de la transferarea ei *ex vitro*: 12000x; ca = canalicule; s = stromă; g = grane; cl = cloroplast; am = amidon; pc = perete celular; sp = spațiu intercelular; M = mitocondrie; c = citoplasmă; V = vacuolă) (*Cachiță* și *Crăciun*, 1991)

gaz, posibil O_2, rezultat din fotosinteză, întrucât granele sunt bine dezvoltate, iar în stromă nu se evidențiază depozite de amidon.

În perioada *aclimatizării*, problema majoră a vitoplantulelor constă într-o cât mai rapidă adaptare a lor la un regim de viață cu o umiditate atmosferică scăzută. Pentru reducerea într-o cât mai mare măsură a pierderii de plantule, pe parcursul aclimatizării acestora la mediul *ex vitro*, *Maene* şi *Debergh* (1981) au recomandat răcirea recipientelor de cultură, în zona lor bazală, creându-se astfel – în sistemul ecofiziologic al flacoanelor cu vitroculturi – un "pol rece", care face ca o parte dintre vaporii din atmosfera vaselor de cultură să se condenseze şi să se acumuleze în mediu agarizat; în acest mod, descreşte umiditatea relativă din vasele de cultură, indirect stimulându-se evapotranspirația şi forțând vitroplantulele să absoarbă apă din substrat, ceea ce realizează o forțare a trecerii treptate a acestora, şi în primul rând a frunzulițelor, la un statut fiziologic din ce în ce mai apropiat de cel normal (după *Vanderschaege* şi *Debergh*, 1987).

În ceea ce priveşte conținutul de CO_2, în atmosfera din recipientele de cultură, *Kozai* şi colaboratorii (1987) au fost de părere că în decursul perioadei de multiplicare, pe parcursul alternanței regimului de lumină cu cel de întuneric (studii efectuate pe nouă specii de vitroplantule), după 8 ore de obscuritate, conținutul de CO_2 în aerul din recipientele de cultură atinge valori de până la 9000 ppm, pentru ca după primele două ore de iluminare, nivelul CO_2-ului să scadă la 70-80 ppm. Experimentul a scos în evidență faptul că vitroplantulele sunt capabile de fotosinteză, dar disponibilul de CO_2 din flacoane, în perioada de iluminare, este foarte scăzut, ceea ce face ca acest proces să nu se poată desfăşura. Pe de altă parte, existența zaharozei în mediul de cultură inhibă activitatea ribulozodifosfatcarboxilazei (RUBISCO). Dacă frunzulițele prezente la nivelul vitroculturilor – în decursul regimului de viață mixotrof sau heterotrof – sunt înlăturate, vitroplantulele respective pot să devină autotrofe, dacă sunt transferate pe medii lipsite de zaharoză, noile vitrofrunzulițe dezvoltându-se în regim fotoautotrof, cu o puternică activitate RUBISCO (după *Grout* şi *Price*, 1987). Dacă în perioada de înrădăcinare a vitroplantulelor de căpşun a fost ridicată intensitatea luminoasă la 250µmol $m^{-2}s^{-1}$ PPF (Photosynthetic Photon Flux), iar concentrația de CO_2 a fost mărită la 3000 ppm, acestea au crescut bine şi în lipsa zaharozei din mediu, vitroplantulele respective fiind aclimatizate *ex vitro* cu succes, întrucât anatomia frunzei, mai ales structura celulelor epidermale şi a celor mezofiliene ameliondu-se foarte mult. Fixarea CO_2 a fost legată de nivelul de fosfoenolipiruvatcaboxilaza din frunzulițe (după *Laforge* şi colab., 1991, care au citat experimentele efectuate de către o echipă de cercetători canadieni, întreprinse între anii 1987-1989).

Unul dintre handicapurile pe care ex vitroplantulele trebuie să le depăşească se referă la faptul că frunzele acestora, pe parcursul menţinerii lor în regim aseptic de viaţă, au stomatele nedezvoltate, cu osteole larg deschise şi nefuncţionale. Mărind intensitatea luminoasă de la 25 la 80 μmol $m^{-2}.s^{-1}$ PPF şi reducând gradul de hidratare al atmosferei din vasele de cultură, de la o umiditatea maximă de 100%, la 75%, în epiderma frunzuliţelor vitroplantulelor de trandafir se impulsionează formarea unui aparat stomatic funcţional (după *Capellades* şi colab., 1990). *Marin* şi colaboratorii (1988) au semnalat faptul că aproximativ 75% dintre stomatele frunzuliţelor vitroplantulelor de prun au devenit apte de închidere şi deschidere, după aproximativ 15 minute de la scăderea umidităţii atmosferice la 45%. În schimb, *Brainerd* şi *Fuchigami* (1982) şi *Wetzstein* şi *Sommer* (1982) au fost de părere că stomatele frunzuliţelor ex vitroplantulelor, dezvoltate în regim *ex vitro*, prezintă caractere morfostructurale şi fiziologice intermediare, fie asemănătoare cu cele existente în epiderma vitrofrunzuliţelor, fie având o dezvoltare normală, ca a stomatelor frunzelor plantelor de seră, în timp ce *in vitro* numeroase stomate se află doar în stadiul de primordii.

În general, frunzuliţele prezente la nivelul vitroplantulelor sunt subţiri şi în decursul procesului de aclimatizare – cca. 3-4 săptămâni de la trecerea *ex vitro* a culturilor – acestea trebuie să fie umbrite, protejate de incidenţa directă a razelor solare. La unele specii, perioada de aclimatizare poate să se prelungească până la aproximativ 4 luni. Pentru a scurta durata acestui proces, *Murashige* (1974) recomanda o prealabilă pregătire a vitroculturilor, încă din perioada în care acestea se află închise în recipientele de cultură. În etapa pregătitoare, intensitatea luminoasă – la nivelul vitroculturilor – trebuie ridicată de circa 3-10 ori, astfel încât aceasta să atingă un prag de circa 10.000 lucşi, ceea ce facilitează o mai normală alcătuire morfoanatomică a frunzuliţelor vitroplantulelor, uşurând parcurgerea cu mai mult succes a stresului de transfer *ex vitro*, în decursul perioadei de aclimatizare.

La vitrofrunzuliţele lipsite de calităţile morfofiziologice caracteristice plantulelor normale, alcătuirea sistemului radicular al vitroplantulelor lasă mult de dorit, în primul rând prin puţinătatea rădăcinilor şi absenţa perişorilor absorbanţi de pe ele şi, în al doilea rând, prin slaba ramificare a rădăcinităţelor regenerate la baza vitroplantulelor şi lipsa micorizelor sau a bacteriilor simbionte. Uneori, rizogeneza poate fi realizată la un nivel satisfăcător (vezi fig. 36 şi 37) şi *in vitro*, alteori, este obligatorie formare *ex vitro* a rădăcinilor, după transferarea acestora în regimul septic de viaţă.

Rowe (1986) aprecia că stresul de transplantare este mai bine suportat de către vitroplantule, dacă înrădăcinarea acestora se face în

"dopuri" din poliuretan sau din spume duroplast, preparate pe bază de fenoli netoxici. Rădăcinile neoformate în aceste condiții au fost de bună calitate și au prezentat perișori absorbanți (*Gebhardt*, 1985). *McCown* (1986) a descris un alt sistem de suporturi, ca niște "dopuri" (plug systems), pentru înrădăcinarea *ex vitro* a micropropagulilor, sistem care se pretează rapid la automatizare, permițând atât standardizarea produselor utilizate pentru micropropagare, cât și a celor de plantare a acestora într-un substrat definitiv. "Dopurile" trebuie să fie netoxice, să aibă capacitatea ridicată de echilibrare a pH-ului (tamponare), să permită cu ușurință dezvoltarea sistemului radicular, să fie lipsite de agenți patogeni și de pesticide. Tehnica cultivării în "dopuri" constă în utilizarea ca substrat a unui amestec de turbă și a unui liant hidrofil, cu un pH 6,3. Dimensiunile standard ale acestora sunt: adâncime de 4,45 cm (sau 6,35 cm) și diametru de 1,25 cm (sau chiar de 1,9 cm). La plantare, "dopurile" pot fi îndepărtate și, astfel, rădăcinile eliberate. Pe perioada înrădăcinării, "dopurile" care susțin plantulele vor fi amplasate în ochiurile unor suporturi din spumă de polistiren (cu dimensiunea de 33x33 cm). Săptămânal, cultura realizată trebuie stropită cu o soluție nutritivă, minerală, diluată. Metoda s-a dovedit a fi deosebit de eficientă, mai ales în situația aclimatizării la condițiile vieții *ex vitro* a vitroplantulelor de specii lemnoase.

Brochard (1985) a folosit ca substrat de înrădăcinare un produs special MILCAR, susținând că prin acest procedeu sunt rezolvate marile probleme pe care le ridică înrădăcinarea și acomodarea vitroplantulelor la mediul septic de viață.

Întrucât s-a constatat că prețul de cost al materialului de plantat generat pe medii aseptice crește pe măsura prelungirii duratei de menținere a plantulelor *in vitro*, se ridică din ce în ce mai serios problema transferării cât mai de timpuriu a acestora din mediul aseptic, direct în câmp. Astfel, *Levy* (1985) a descris o metodă de transferare a plantulelor de cartof, din "vitro", direct în câmp, prin administrarea în teren de irigații succesive. Se pune și problema reconsiderării aplicării la nivelul plantulelor generate *in vitro* a unor tratamente foliare, cu agenți antitranspiranți, pentru a reduce pierderea de apă în perioada critică de acomodare a vitroplantelor la condițiile climei din câmp (agenții antitranspiranți trebuie, însă, administrați în concentrații mai moderate, decât în mod normal).

Înrădăcinarea *in vitro* ridică cu 35% până la 75% costurile materialului de plantat (după *Debergh* și *Maene*, 1981). În cazul înrădăcinării *ex vitro* a butașilor confecționați din tulpinițele regenerate *in vitro* ori a propagulilor, aceștia trebuie să dispună de un regim termic controlat, atât în

substratul de cultură, cât şi în atmosfera din incintele de aclimatizare. În sere se recomandă o încălzire a substratului în zona bazală a butaşilor şi asigurarea unei temperaturi mai scăzute (aer rece) în zonele apicale ale acestora. Răcirea atmosferei şi mărirea umidităţii în zona superioară a butaşilor sau a propagulilor, pe parcursul înrădăcinării acestora, printr-o saturare a incintei de aclimatizare cu vapori de apă (fie prin generarea de ceaţă), conduce la o reducere a temperaturii ambiante, cu până la 3-4^{0}C. În această perioadă, trebuie să se aibe în vedere ca substratul să nu fie inundat cu apă, pentru ca la nivelul sistemului radicular să nu intervină un regim de hipoxie şi de anaerobioză, care ar deteriora rapid vitalitatea rădăcinilor şi calitatea materialului de plantat rezultat în final.

După *Brochard* (1991), pentru înrădăcinare este preferabilă utilizarea substraturilor artificiale, constând din poliuretan sau din vată minerală. *Boxus* şi colaboratorii (1995) au recomandat utilizarea în acest scop a unui amestec constând dintr-o parte vermiculit, cu trei părţi turbă. Fertilizarea substratului se face periodic, cu soluţii saline, diluate, administrate după metoda nutriţiei în picătură.

În momentul plantării, ex vitroplantulele, propagulii ori minibutaşii (lăstari neînrădăcinaţi) riscă să fie atacaţi de agenţii fitopatogeni prezenţi în sol, atacuri care pot periclita viaţa plantulelor, producând infecţii fie la nivelul coletului, fie la nivelul rădăcinilor (atac cu *Pythium* sau cu *Botrytis*). De aceea, *solul* este bine să fie dezinfectat, prin administrarea de antifungice cu spectru larg, slab fitotoxice, cum ar fi cu o soluţie de 5-10 mg/l de TMTD (Thiram) (după *Boxus* şi colab., 1995).

Pe durata perioadei de aclimatizare pot fi aplicate tratamente antifungice sau, dimpotrivă, pot fi utilizate preparate de *micorizare*, pentru facilitarea formării de micorize simbionte, fapt care asigură o nutriţie mai bună şi o mai mare rezistenţă a *ex* vitroplantulelor la stresul de transplantare şi la îmbolnăvire (după *Gianinzzi* şi colab., 1989). Astfel, în cazul speciilor de pomi fructiferi, viţă-de-vie, căpşun şi altele, substratul de aclimatizare este recomandabil să fie inoculat, prealabil plantării în el a ex vitroplantulelor, cu specii de *Glomus*; măsura conduce, în decurs de aproximativ 30 de săptămâni, la formarea unui sistem radicular mai ramificat, situaţie care se va îmbunătăţi, într-o şi mai mare măsură, în cel de al doilea an de viaţă al plantelor (*Rapparini* şi colab., 1994).

În general, aclimatizarea durează circa 3-4 săptămâni, întrucât formarea unui sistem radicular, complementar, se realizează după aproximativ 2-3 săptămâni de la amplasarea ex vitrolantulelor în substrat. Dovada

unei bune funcțiuni a acestora este apariția unei prime frunze, în condițiile mediului septic.

La unele specii vegetale (garoafe, sfeclă, conopidă, forsiția, coleus etc.), în regimul de vitrocultură se întâlnește fenomenul de vitrificare, numit și hiperhidrie. În astfel de cazuri, tulpinițele și frunzulițele regenerate la nivelul variatelor categorii de explante, la un moment dat (fie după o perioadă de depășire a temperaturii de 27^0C, fie în urma creșterii concentrației de etilenă în atmosfera din recipientele de cultură, respectiv din celule etc.), devin sticloase (de unde derivă și denumirea de vitrificare dată acestui fenomen). Țesuturile și celulele acestor organe sunt hiperhidrice, treptat, devin și hipertrofiate, culturile continuând să crească luxuriant. Astfel de vitroplantule au un mare dezavantaj, întrucât ele *nu pot fi aclimatizate* la viața *ex vitro*. Scoase din *vitro*, ele mor. În celulele mezofilului foliar (fig. 40A și B) citoplasma acestor celule este peliculară și în curs de dezorganizare, iar vacuomul este uriaș și sucul vacuolar prezintă depozite și conglomerate variate (după *Cachiță* și *Crăciun*, 1990). Pereții celulari sunt subțiri, iar cloroplastele au formă de clopot (fig. 40A-C); la nivelul stromelor se petrece un proces de izolare a granelor spre periferia cloroplastului, partea dinspre interior a stromei vacuolizându-se (fig. 40A și B); după un timp cloroplastele se destind (fig. 40D), dar dobândesc forme mult alungite, aspecte care dovedesc o disfuncție a acestora (*Cachiță*, 1987; *Cachiță* și *Crăciun*, 1990). Apariția acestui fenomen într-o unitate de producție este catastrofală, deoarece vitroplantulele respective nu pot fi aclimatizate și sunt pierdute. Preîntâmpinarea unei astfel de situații este dificilă. S-au făcut numeroase cercetări în vederea contrabalansării procesului de hiperhidrie (vitrificare), dar rezultatele sunt slabe și chiar dacă se reușește salvarea zonei apicale, prin transvazarea acesteia pe alte medii, cu concentrații ridicate în agar, sau cu aport de $AgNO_3$, pentru inhibarea sintezei de etilenă, și altele (vezi *Cachiță*, 1987), în practică, doar controlarea strictă a temperaturii constituie o măsură salutară.

Opus situației descrise, vitroplantulele generate în vitroculturi fotoautotrofe (vezi *Cachiță*, 1987 și *Cristea*, 1999), pe medii lipsite de glucide, dar cu atmosfera mult îmbogățită în CO_2 și o iluminare sporită (pentru detalii a se consulta capitolul dedicat culturilor fotoautotrofe din volumul 2 al *Tratatului de biotehnologie vegetală*, în curs de elaborare), postaclimatizarea acestora la condițiile naturale de viață, aparatul lor fotosintetic și morfologia frunzelor se apropie de aceea a frunzulițelor normale, drept pentru care ex vitroplantulele supraviețuiesc în procent de peste 90%.

Referințele bibliografice se găsesc la pagina 228.

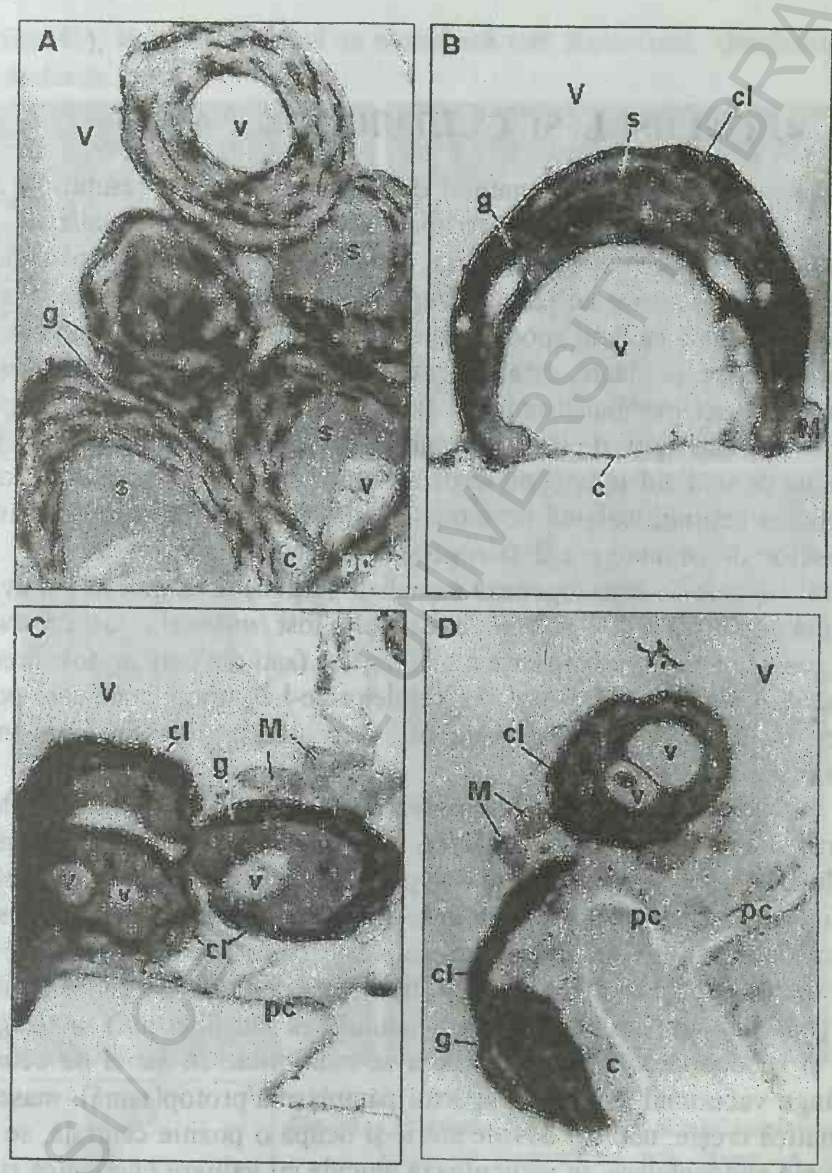


Fig. 40. Aspecte ultrastructurale ale celulelor mezofiului foliar al frunzulițelor vitroplantulelor de garoafe vitrificate (hiperhidrice); A și D = cloroplaste contractate, în formă de clopot, cu stroma hipertrofiată (A și C); B și C cloroplaste în formă de clopot, dar deformat cu vacuolizări; D = cloroplast alungit, destins (stânga) și cloroplast vacuolizat (dreapta); (c = citoplasmă; M = mitocondrie) cl = cloroplast; s = stromă; g = grane; pc = perete celular; V = vacuolă: v = vacuolizare stromă cloroplast). (A,C și D = 6000x; B = 12000x) (*Cachiță* și *Crăciun*, 1990; 1991)

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

4. CALUSUL ŞI CULTURA DE CALUS

Primele reuşite în domeniul culturilor *in vitro* de țesuturi şi celule vegetale sunt considerate cele referitoare la cultura de *calus*, realizată – între anii 1934-1939 – de către *Gautheret*, *Nobécourt* şi *White*, care până la atingerea acestui deziderat au parcurs importante etape experimentale, perioadă unanim acceptată ca fiind epoca de pionierat a biotehnologiei vegetale.

Calusul, la plante, este o formațiune tisulară, cu celule proliferative, cu caracteristici morfoanatomice şi fiziologice particulare, cu totul speciale în raport cu alte tipuri de țesuturi vegetale, el fiind constituit dintr-un masiv de celule ce se divid activ şi nu se diferențiază decât dacă în celulele lor este prezentă o anumită balanță hormonală, capabilă să influențeze declanşarea proceselor de organogeneză (rizogeneză sau caulogeneză), ori – în vitrocultură – şi cele de embriogeneză somatică. Regenerarea de calus şi evoluția acestuia depind atât de *condițiile* în care el a fost *inițiat* şi a fost *crescut*, cât şi de *specie*, de *organul* din care a luat naştere (sau din care au fost prelevate explantele), de *starea fiziologică* a celulelor ce-l compun, stare care poate fi caracterizată printr-un proces metabolic activ, sau prin declin funcțional ori prin senescență.

Calusul poate avea o origine variată, după cauzele care au condus la generarea acestuia. Astfel, în natură, formarea de calus are loc la nivelul zonelor rănite, el exercitând un rol protector, de *cicatrizare*. Celulele din imediata apropiere a țesuturilor lezate, atunci când în zonă există meristeme, sub influența fitohormonilor şi sub impulsul factorilor traumatogeni, încep să se dividă activ; dacă meristemele lipsesc, o parte dintre celulele diferențiate (mai ales unele celule ale periciclului sau ale liberului) se *dediferențiază* şi redobândesc capacitatea de a se multiplica. În astfel de celule, se restrânge vacuomul (scăzând raportul paraplasmă/protoplasmă), masa citoplasmatică creşte, nucleul devine sferic şi ocupă o poziție centrală, se reduc rezervele endocelulare, se vehiculează glucide cu valoare energetică ridicată (energia fiind necesară pentru susținerea proceselor mitotice şi a celor de creştere celulară) şi se reinstalează aptitudinea mitotică. Celulele rezultate formează calusul restituțional, reparator, ce izolează şi protejează zona lezată de acțiunea directă a mediului extern şi de atacul agenților fitopatogeni. De regulă, în cazul plantelor lemnoase, calusul de cicatrizare apare în urma tăierii sau a ruperii unor ramuri, ori a trunchirilor de copaci. Cu timpul, pe măsură ce calusul se formează, acesta se exteriorizează ca o excrescență, care – la copaci – are o formă circulară sau ovală, ce înconjoară zona

rănită (fig. 41); la butaşi calusul se manifestă sub forma unui conglomerat tisular, noduros.

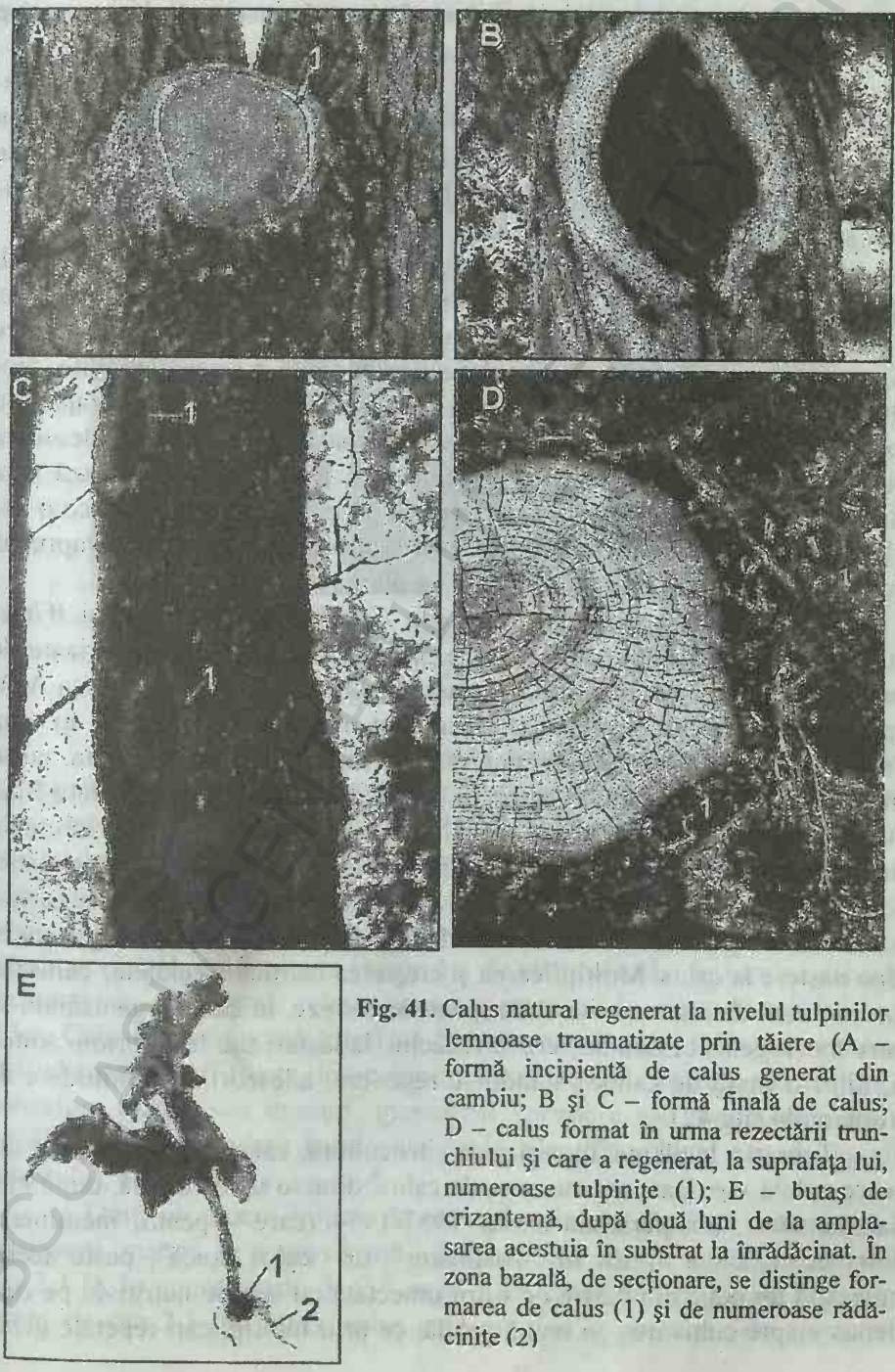


Fig. 41. Calus natural regenerat la nivelul tulpinilor lemnoase traumatizate prin tăiere (A – formă incipientă de calus generat din cambiu; B şi C – formă finală de calus; D – calus format în urma rezectării trunchiului şi care a regenerat, la suprafaţa lui, numeroase tulpiniţe (1); E – butaş de crizantemă, după două luni de la amplasarea acestuia în substrat la înrădăcinat. În zona bazală, de secţionare, se distinge formarea de calus (1) şi de numeroase rădăcinite (2)

În natură, și *in vitro*, tot un țesut proliferativ, generator de calus este și țesutul tumoral, provocat de variate cauze biologice, cum ar fi: atac fungic, bacterian, virotic, tumori genetice sau induse de insecte (subiect pe care îl vom dezvolta în volumul doi al prezentului tratat).

Țesut calusal, restituțional, este generat și la nivelul zonelor de contact dintre portaltoi și altoi; fragmentul grefat suturându-se de portaltoi prin intermediul unui țesut proliferativ, calusal, la locul altoirii, realizându-se treptat o comunicare tisulară, cale de integrare a altoiului în circuitul nutrițional și fitohormonal al portaltoiului.

Un fenomen asemănător se produce și la marcotele îngropate în sol, în porțiunile încrestate, în scopul facilitării formării de rădăcini adventive. Un țesut calusal se dezvoltă și la nivelul ramurilor lemnoase, tinere, la care se întrerupe voit, prin inelare, circulația descendentă a sevei elaborate, procedură utilizată în arboricultură pentru înmulțirea vegetativă, mai rapidă, a unor specii; după tăiere, zona respectivă se împachetează în turbă; deasupra zonei inelate, în timp, se va dezvolta un calus, în care se acumulează seva elaborată, bogată și în fitohormoni, calus la nivelul căruia se produce o stimulare a rizogenezei, moment în care partea superioară a ramurei, împreună cu calusul, se va detașa de aceasta și se va planta în sol.

In vitro însă, așa cum au dovedit *Gautheret*, *Nobécourt* și *White*, calus a putut fi regenerat din explante prelevate din rădăcini tuberizate de morcov, sau din măduvă de tutun, ori din cambiu secundar, în prezența AIA. Explantele constituite din țesut cambial sunt meristeme secundare, în timp ce măduva de tutun este un parenchim care, în mod natural, spontan, nu se multiplică (spre deosebire de cambiu), decât dacă celulele – inoculate fiind *in vitro* – devin autonome și sub impulsul auxinei, sau a prezenței în mediu a unui amestec de auxină cu citochinină, acestea se dediferențiază și astfel se declanșează procese de multiplicare celulară, ele ne mai păstrându-și statutul lor histologic, devin o masă amorfă de celule, care-și pierd organizarea și dau naștere la calus. Multiplicarea și creșterea haotică a celulelor calusale, la un moment dat, în anumite zone, poate să sisteze, în calus organizându-se centre morfogene, ce dau naștere la rădăcini, la lăstari sau la embrioni somatici, dintr-o masă de calus putându-se regenera, adeseori, o multitudine de vitroplantule (fig.42).

Teoretic, la plante, în regim de vitrocultură, calus poate fi obținut din oricare celulă vie. Dar, regenerarea de calus, dintr-o unică celulă, după modelul lui *Muir*, din perioada anilor 1953-1954 (care – pentru menținerea celulei în viață - a folosit un "susținător", un "calus doică", peste acesta amplasând un petic din hârtie de filtru umectată cu soluție nutritivă, pe care a depus – spre cultivare – o unică celulă, ce prin multiplicări repetate gene-

reză calus), sau prin etalarea unei suspensii celulare pe o placă de mediu agarizat (vezi fig. 33), metodă concepută de *Bergmann*, în anul 1960, sunt proceduri de durată, care necesită condiții de cultură dificil de standardizat.

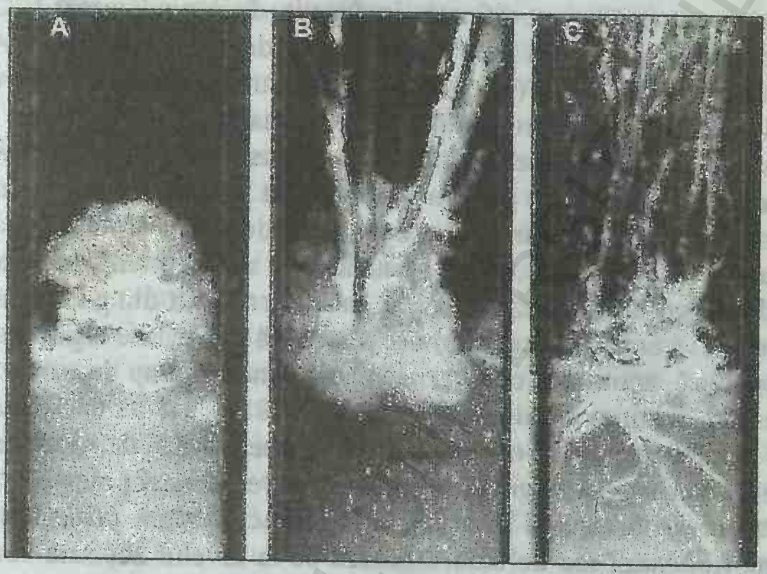


Fig. 42. Calus de sparanghel lipsit de organogeneză (A), ori cu caulogeneză, dar lipsit de rizogeneză (B), sau cu o puternică caulogeneză și cu rizogeneză moderată (C)

Calusogeneza sau calogeneza *in vitro* poate fi realizată, în general, cu ușurință, din material vegetal de proveniență variată, chiar și din țesuturi cu o structură definitivă, ale căror celule pot, prin dediferențiere, să revină la starea de meristem. De exemplu, prin inocularea a variate tipuri de explante (parenchim de rezervă sau liber secundar, fragmente de frunze, tulpini, muguri, boboci, segmente de hipocotile, rădăcinițe ori de cotiledoane etc.), pe medii cu 2,4-D, după câteva săptămâni de vitrocultură – în lumină difuză ori la întuneric – se ajunge relativ ușor la generarea de calus, la nivelul inoculilor. Calusogeneza poate fi indusă cu bune rezultate, și folosind ca material inițial semințe, ori fructe de tip cariopsă sau achenă, imature sau mature, ori embrioni maturi sau imaturi, meristeme (primare sau secundare), apexuri caulinare ori radiculare (prelevate de la plantule, plante sau de la vitroplantule), antere, ovare, ș.a.m.d.

Dintr-un inocul inițial, de exemplu dintr-o sămânță matură sau din embrioni imaturi, se poate obține – în decurs de câteva săptămâni, pe mediu cu 2,4-D, în concentrație de 2,5 mg/l – un calus de *tip primar* (cu dimensiuni de cca 2,5 cm/7cm), calus care conține o populație de aproximativ

50.000 celule. După circa 6 săptămâni de vitrocultură, calusul primar – fiind suficient de bine dezvoltat – poate fi transferat (subcultivat) pe un mediu proaspăt, de o aceeaşi compoziție cu mediul de inițiere, sau pe un mediu de cultură cu o compoziție modificată, în funcție de scopul urmărit. Calusul aflat la o primă subcultură poartă denumirea de calus *secundar*. Acesta, după ce va creşte în volum (în circa o lună) va trebui să fie subcultivat din nou, pe un mediu proaspăt, rezultând calusul terțiar etc.

În general, la plantele dicotiledonate, calusul este indus cu mai multă uşurință decât la speciile de gimnosperme sau la cele de monocotiledonate. Se cunosc cazuri de calusuri, de exemplu cel de tutun (*Nabors* şi colab., 1980), care repicat periodic, chiar şi după cinci ani îşi mențin o capacitate ridicată de a regenera plante; în schimb, calusul provenit din plante monocotiledonate (de exemplu de cereale) are o scăzută capacitate regenerativă, şi de morfogeneză, aptitudine ce se poate păstra, uneori, timp de numai câteva săptămâni de la inițierea calusului (*Conger*, 1981). *Nabors* şi colaboratorii au reuşit să ridice de 10-15 ori capacitatea regenerativă şi de morfogeneză a calusului de cereale, prelungind în timp menținerea acestei potențe.

În geneza de calus şi în creşterea lui, caracteristicile calusului, procesele de morfogeneză sau de embriogeneză de la nivelul acestuia vor fi dependente nu numai de *natura*, ci şi de *concentrația regulatorilor de creştere* prezenți în mediile de cultură, substanțele din familia acizilor fenoxiacetici, cum sunt 2,4-D-ul şi 2,4,5-T-ul (acidul 2,4,5-triclorfenoxiacetic), în concentrații de 1-10 mg/l, sunt cei mai eficienți compuşi în inducerea şi susținerea proliferării calusului.

Gautheret, în monografia sa publicată în anul 1959, a analizat detaliat complexele probleme pe care le ridică cultura de calus, începând de la generarea lui *in vitro*, din variate categorii de explante, crescute pe diferite medii de cultură, în condiții ecofiziologice adecvate, subliniind cerințele, proprietățile, caracteristicile histologice şi competențele acestuia. În prezentul capitol, vom trata principalele aspecte referitoare la vitrocultura calusului *normal*.

Cu toate că, referirile cu privire la cultivarea *in vitro* a țesutului calusal abundă în literatura de specialitate (el fiind relativ uşor de generat, la nivelul variatelor categorii de explante cultivate *in vitro*), după cum preciza şi *Pierik* (1984), este dificil de stabilit reguli generale cu privire la inducerea şi conducerea culturii de calus, cerințele fiind variate, după cum variabil este şi statutul morfofiziologic şi genetic al materialului vegetal utilizat în acest scop. În vitrocultură, uneori, pentru geneza de calus este necesară doar o auxină, alteori doar o citochinină iar – în alte cazuri – un amestec de auxină şi citochinină. Există însă şi explante care *in vitro* generează un calus *habi-*

tuat sau *anergic*, ce produce fie citochinină, fie auxină nativă, fie vitamine, acesta devenind astfel autotrof în raport cu anumiţi fitohormoni sau vitamine. Cele mai sigure recomandări pentru obţinerea – în scurt timp – de vitrocalus sunt cele care indică utilizarea unui mediu de bază cu excedent de auxină (mai ales de 2,4-D); o masă bogată de calus se poate regenera şi dacă se combină auxina cu lapte din nucă de cocos (după *Steward* şi colab., 1964). În acest caz, citochininele din laptele de cocos stimulează puternic multiplicarea celulară şi, în consecinţă, viteza de creştere a calusului.

În ceea ce priveşte condiţiile de cultură, regimul termic optim pentru calus este cuprins *între 22 şi 27°C*. Lumina însă exercită influenţe contradictorii. La unele explante, în formarea şi creşterea calusului lumina poate fi indispensabilă, în timp ce la altele, este nevoie de întuneric.

Calusul aflat în proliferare activă este, în general, omogen constituit din parenchim. Primele elemente de diferenţiere, care apar – mai ales în calusul adult sau în cel senescent – sunt elementele de xilem, proces concretizat prin formarea de vase lemnoase scurte, ori a unor celule suberizate sau secretorii şi, mai rar, a unor trihomi, în funcţie de tipul inoculului (dacă este calus primar sau secundar), compoziţia mediului de cultură, regimul din camera de creştere şi, nu în ultimul rând, vechimea culturii. În calusul primar poate să persiste (sau se prelungesc în structura lui) elemente de ţesut conducător, ce provin din inoculul iniţial. Uneori, la suprafaţa calusului se poate forma o peridermă, iar, alteori, meristemoizi, care devin centre organogene.

Un rol important în dezvoltarea calusului îl au nu numai compuşii prezenţi în mediul de cultură, ci şi consistenţa mediilor. Dacă, în general, geneza şi creşterea unor calusuri este favorizată de mediul solidificat cu agar, calus din antere se regenerează mai bine pe mediu semisolid, iar cel de morcov, în submersie, în medii lichide, agitate. Pe medii lichide, calus poate fi regenerat din explante variate, prin susţinerea acestora pe punţi sau cartuşe din hârtie de filtru (*Gautheret*, 1959).

Pe mediu agarizat numai porţiunea bazală a calusului beneficiază de nutriţie directă, celulele periferice – situate la polul opus bazei – fiind indirect aprovizionate cu nutrienţi, ele beneficiind în schimb de o bună oxigenare. În mediul lichid, agitat, atât nutriţia cât şi aprovizionarea celulelor cu oxigen este optimă. În el pot fi cultivate fie calusurile compacte, fie variate categorii de cormofitoinoculi, în scopul obţinerii – la nivelul acestora – de calus. Mediul de cultură lichid nu trebuie să depăşească 30% din întregul volum al vasului de cultură. Mişcarea de rotaţie, optimă, este recomandabil să fie cuprinsă între 80-100 rotaţii/minut.

La *subcultură*, dimensiunea *critică* a fragmentului de calus, utilizat pentru inițierea unei subculturi, va depinde de tipul de calus și de specie, dar, în general, masa de calus nu trebuie să scadă sub 20-100 mg greutate proaspătă, respectiv el trebuie să aibă un diametru de circa 5-10 mm (*Street* și *Henshaw*, 1966).

Gautheret (1959) a menționat faptul că în experimentele sale, în serii succesive de subcultură, a întâlnit calusuri de morcov de compactitate diferită și cu variate capacități de morfogeneză la nivelul acestora, mai peristentă fiind aptitudinea de rizogeneză.

Dependența organogenezei, la nivelul calusului, de compoziția fitohormonală a mediului de cultură a fost demonstrată de *Skoog* și *Miller*, în anul 1957; ei au realizat un tablou sugestiv referitor la variația caulo- rizo- și calogenezei, în funcție de raportul dintre concentrația de AIA și cea de Kin, din mediu; experimentele executate cu calus de tutun au fost urmărite timp de 62 zile; la un raport de 2 mg/l AIA/ 0,5 sau 1 mg/l Kin calusul a rămas parenchimatos și a crescut activ; dacă a scăzut concentrația de auxină la 0,03 mg/l AIA, menținându-se cea a chinetinei (Kin) la 1 mg/l, la nivelul calusului s-a observat stimularea neogenezei de frunzulițe (caulogeneza); dimpotrivă, caulogeneza a fost inhibată, iar rizogeneza a fost stimulată la o balanță hormonală excedentar auxinică, respectiv 2 mg/l AIA, contrabalansată cu 0,02 mg/l Kin.

Organogeneza – geneza de rădăcinițe sau formarea de tulpinițe – la nivelul calusului este adventivă, cele două procese fiind independente unul de celălalt; rădăcinițele se pot forma fie direct din calus, fie la baza tulpinițelor, ori în înaltul acestora. În controlarea proceselor de organogeneză, la nivelul calusului, este greu de stabilit reguli generale, cu atât mai mult cu cât în astfel de experimente există foarte multe variabile, începând de la materialul biologic și continuând cu natura și concentrația regulatorilor de creștere prezenți în mediu, condițiile de cultură, numărul de subculturi, tipul de calus, proveniența lui etc.; dar, în linii generale, aspectele reliefate de *Skoog* și *Miller* (1957) se regăsesc în multe cazuri de vitrocultură.

La nivelul calusului, intensitatea și tipul proceselor de morfogeneză vor depinde de: specie, genotip (fig. 43), mărimea explantelor, natura țesuturilor lezate și specificul celulelor existente în jurul acestora (sau în imediata vecinătate a zonei rănite), mediile de cultură și regulatorii de creștere prezenți în ele, sezonul și condițiile de mediu.

Steward și colaboratorii (1958-1970) au descoperit – la nivelul culturilor de calus și în suspensiile celulare – fenomenul de *embriogeneză somatică*. În general, în inducerea embriogenezei somatice este importantă redu-

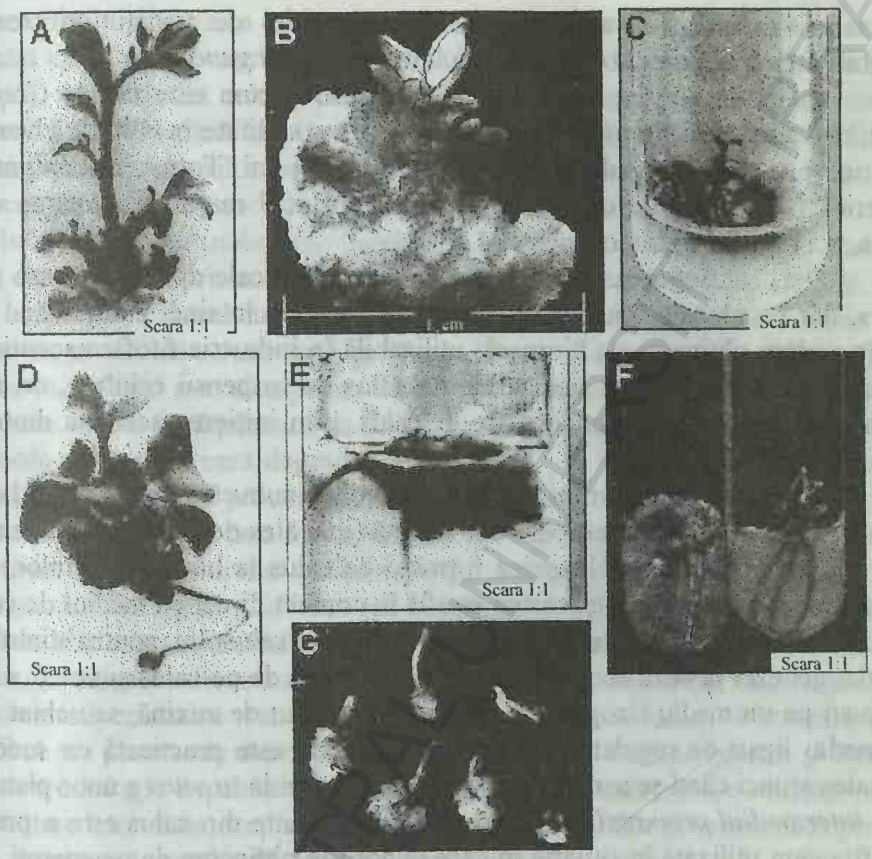


Fig. 43. Tipuri de calusuri regenerate din inoculi variaţi, cultivaţi pe medii de bază cu adaos de 2 mg/l AIA: A – apex cartof; B – (şi 2,4-D 1 mg/l) apex garoafe; C – apex crizanteme; D – propagul gerbera; E – rondelă de internod tânăr de forsiţia; F – nod tânăr de ligustrum; G – antere de conopidă

cerea concentraţiei de regulatori de creştere din mediul de cultură (în special a 2,4-D-ului) şi administrarea azotului sub formă de NH^{-}_{4}.

În micropropagare, regenerarea de calus – la nivelul cormofitoinoculilor – este un *accident* nedorit, întrucât celulele calusului suferă frecvent o poliploidizare. În general, este imposibil de previzionat calităţile ce vor fi deţinute de plantele regenerate dintr-un calus, întrucât în decursul numeroaselor multiplicări suferite de celulele lui, în nuclei pot apare aberaţii cromozomale, sau mutaţii, ori endoreduplicări, respectiv poliploidizări, iar frecvenţa anomaliilor nucleare creşte cu vârsta culturii, în funcţie de specia sau varietatea cultivată, mai ales dacă în mediul de cultură se află compuşi fenoxiacetici sau agenţi mutageni. Instabilitatea cromozomală a celulelor

calusale are însă și avantaje, acelea ale apariției de variații ce crează posibilitatea izolării de *somaclone* și obținerea de *noi genotipuri.*

Cu toate acestea, există și unele calusuri, cum este cel de *Crepis capillaris* sau de *Helianthus annuus*, cu o mare stabilitate în cultură, chiar și în urma practicării de subculturi, mai bine de doi ani. Totuși, instabilitatea genetică a celulelor de calus constituie un obstacol major în clonarea *via* calus, aceasta fiind arareori posibilă.

Dar, calusogeneza *in vitro* poate constitui o cale de multiplicare via calus, dar nu clonală, sau poate reprezenta un scop în sine, atunci când se are în vedere obținerea de biomasă, utilizabilă în industria fitofarmaceutică, fie atunci când se dorește realizarea din calus de suspensii celulare, ori selectarea de somaclone, sau formare de calus, prin inițierea acestuia dintr-o cultură de celule.

De regulă, prin administrarea în mediul de cultură a unei balanțe hormonale neechilibrate, cu excedent de auxină (mai ales de 2,4-D) sau de citochinină, se facilitează declanșarea formării de calus la baza explantelor, cu precădere în zonele în care acestea se află în contact direct cu mediul de cultură. În situația formării de mugurași, pe suprafața calusului, pentru stimularea rizogenezei la baza acestora, ei vor fi desprinși de pe calus și vor fi subcultivați pe un mediu rizogen, cu un conținut scăzut de auxină, sau chiar pe un mediu lipsit de regulatori de creștere; metoda este practicată cu succes mai ales atunci când se urmărește multiplicarea rapidă *in vitro* a unor plante, prin *intermediul propagulilor*. Regenerarea de plante din calus este o practică frecvent utilizată în situația în care se dorește obținerea de regenerați, în cazul somaclonelor, respectiv a selectării de reprezentanți deviați genetic, în raport de genotipul de origine.

În vitrocultură, *creșterea* calusului poate fi *indefinită* în timp, atunci când el este înmulțit și cultivat la infinit, prin repicări și subcultivări operate periodic, succesiv, respectiv prin divizarea calusului regenerat după mai multe săptămâni de cultură primară sau de subcultură, în mai multe fragmente și subcultivarea acestora pe medii proaspete, adecvate – din punct de vedere compozițional – susținerii proceselor proliferative sau a celor de morfogeneză. Calusul, pentru a-și menține vigurozitatea și capacitatea de multiplicare, se recomandă, în general, să fie repicat la intervale de circa 4-6 săptămâni, viteza de regenerare și de creștere a acestuia fiind strâns corelată cu: *originea* lui, *natura* țesuturilor din care el provine, *condițiile* de cultură, *regulatorii de creștere* prezenți în mediu (tipul acestora, concentrațiile, amestecurile și proporțiile administrate), numărul de subculturi suportate în antecedență, *starea* fiziologică a celulelor sale situate în profunzime, sau în zonele lui externe etc. În cazul în care mediul extern este hiperosmotic (de

exemplu în situaţia în care calusul este pregătit pentru crioconservare, fiind tratat cu substanţe osmotic active, de exemplu cu DMSO, cu sau fără zaharoză), apa iese din celule, prin exosmoză, şi conţinutul celular se contractă (vezi fig. 44D) până la pierderea totală a apei libere din vacuolă (fig. 44D jos). Acest tip de calus poate fi crioconservat în azot lichid, urmând ca după decongelare, prin subcultură, celulele calusului să se deplasmolizeze. Dacă celulele sunt menţinute timp îndelungat în stare de plasmoliză, fără congelare, ele vor sfârşi prin a muri, starea de plasmoliză devenind ireversibilă.

Dacă calusul nu este subcultivat în timp util, celulele lui vor intra într-un proces de *senescenţă*, producându-se o îmbătrânire a acestuia, fenomen manifestat mai ales printr-o încetinire a creşterii şi o schimbare a culorii sale. Într-o fază primară de senescenţă, în celulele atinse de această stare fiziologică, prevalează degradarea proteinelor, în raport cu sintetizarea acestora, în procesul de proteosinteză intervin erori, mai ales în ceea ce priveşte structura enzimelor nou formate, scade masa citoplasmatică, se dezvoltă un puternic sistem lizozomal şi vacuolar, de autofagocitoză, în celule se formează numeroase figuri mielinice (de comparat imaginile cu aspecte ultrastructurale, din calusul normal – fig. 44 cu cele care redau degradările endocelulare din calusul senescent – fig. 45), apar variaţi microcorpi, multivezicule şi incluziuni cristaline sau amorfe. În senescenţa avansată, biomembranele suferă un proces de dezorganizare, plastidele se dezmembrează şi întregul tablou citologic exprimă o gravă degradare ultrastructurală, cu nuclei picnotici stare care duce, treptat, la moartea celulelor aflate în senescenţă profundă. Senescenţa profundă conduce la moarte prin necroză.

Textura, culoarea şi structura anatomică a calusului constituie caracteristici foarte variabile, mai ales în funcţie de specie, de natura şi provenienţa inoculului, compoziţia mediului, condiţiile de cultură, vârsta calusului, dacă calusul se află în cultură primară sau în subcultură etc.

Calusul poate fi compact, friabil (spumos) sau de consistenţă şi structură intermediară. Explante similare ca specie, provenienţă, mărime, cultivate în acelaşi regim termic, în lumină difuză, pe medii de compoziţii fitohormonale variate, pot genera calus cu caracteristici diferite din punct de vedere morfologic. Astfel, explante prelevate din rădăcini metamorfozate de morcov, identice ca mărime şi structură morfoanatomică (de formă cilindrică, cu diametru de 7 mm şi cu o lungime de 4,5 mm), în zona lor centrală cu cambiu, de o parte a acestuia cu floem secundar, iar de partea cealaltă a lui cu xilem secundar), după două luni de vitrocultură, pe medii lichide, agitate, generează calusuri de dimensiuni, consistenţă, culoare şi structuri variate, astfel: pe mediu cu AIA, 1 mg/l şi pe cel cu procaină 1 mg/l, din cambiul explantelor s-a regenerat câte un calus, de culoare

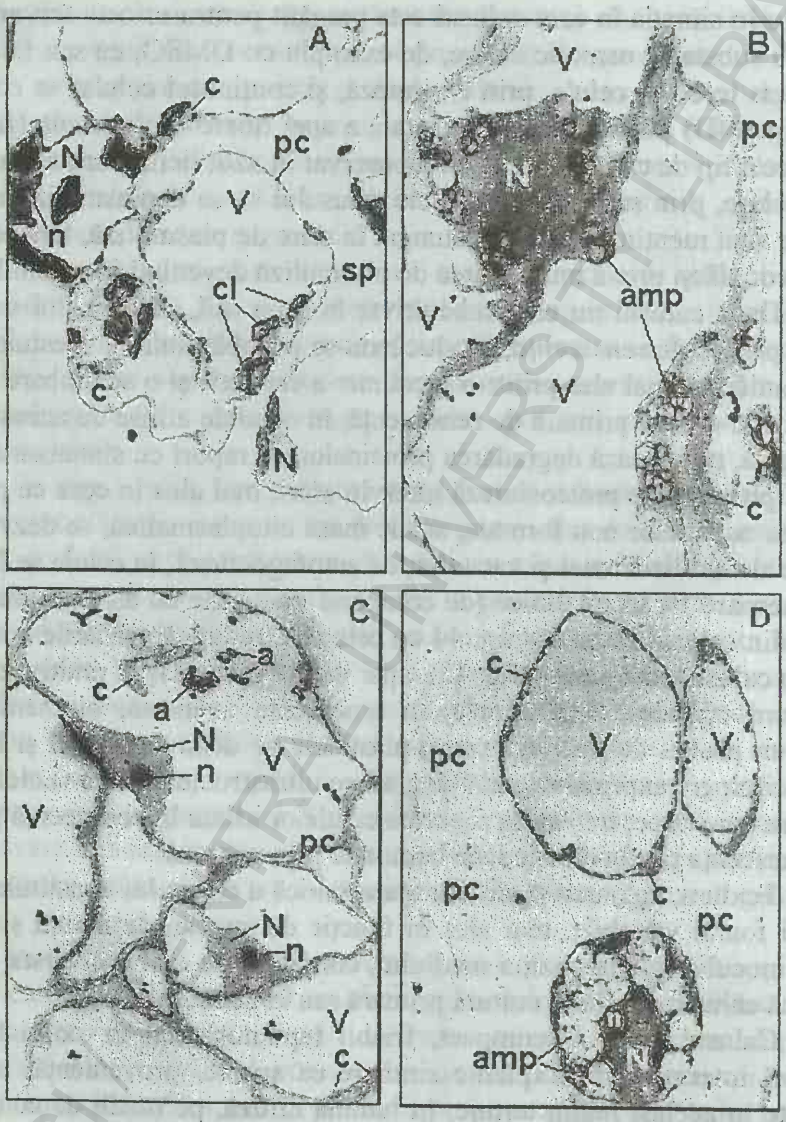


Fig. 44. Aspectul ultrastructural al celulelor calusale. A – calus verde, cu cloroplaste (2800x); B – calus albinotic, cu amiloplaste (16600x); C – celule calusale cu antociani conglomerați (5200x); D – celule calusale în mediu hipertonic (sus: două celule în curs plasmoliză; jos: celulă plasmolizată) (5200x), unde: a – antociani conglomerați; amp – amiloplast; cl – cloroplaste; c – citoplasmă; N – nucleu; n – nucleol; pc – perete celular; sp – spațiu intercelular; V – vacuolă

verde, ușor buretos și catifelat, care la periferie a prezentat o zonă multistratificată de meristem proliferativ (fig. 46); pe mediu cu 2,4-D 2 mg/l

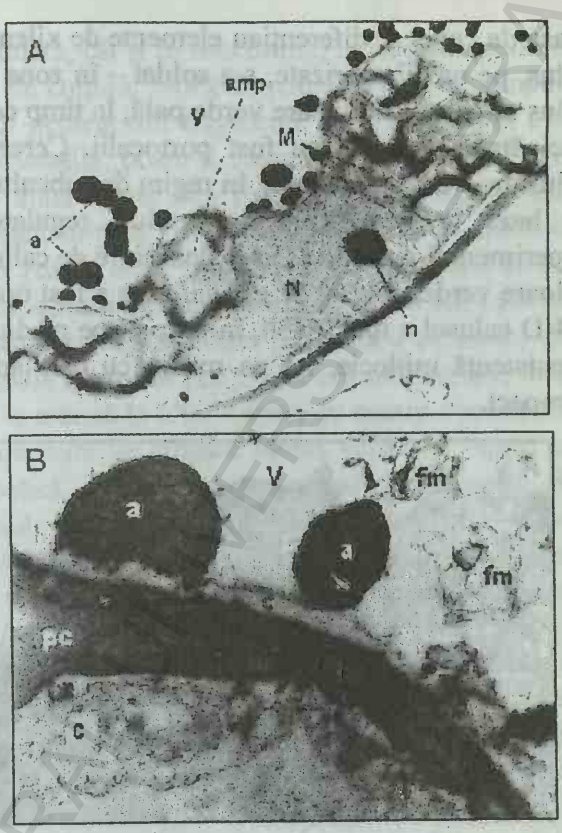


Fig. 45. Aspecte ultrastructurale din celulele calusului senescent, unde:
A – celulă nucleată şi cu pigmenţi antocianici corpusculaţi (6.600x);
B – celulă în curs de dezorganizare (12.200x);
fm – formaţiuni mielinice;
amp - aminoplaste;
N – nucleu;
n – nucleol;
c – citoplasmă;
M – mitocondrie;
pc – perete celular;
V – vacuolă;
a – corpusculi antocianici

(fig. 47A şi C) a luat naştere un calus mai friabil, verde-pal, ca un vulcan din craterul căruia proliferau celule, care la suprafaţă erau laxe (fig. 47B). În

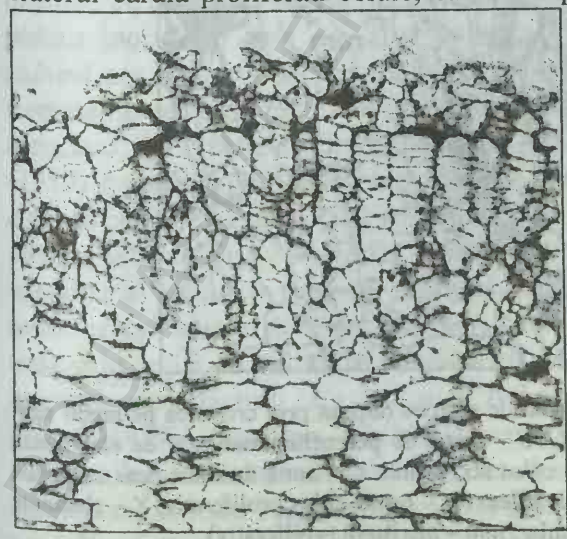


Fig. 46. Aspectul microscopic al zonei periferice a calusului de morcov obţinut prin creşterea pe medii de cultură lichide, agitate, a unor explante cilindrice de rădăcini metamorfozate de morcov, prelevate din zona cambiului, submersate timp de două luni în mediu de bază cu AIA 1.10^{-7}

masa de calus se diferențiau elemente de xilem (fig. 47A și C). Inițierea de calus, pe medii agarizate, s-a soldat – în zona cambiului – cu generarea de calus noduros, de culoare verde pală, în timp ce pe același inocul zonele din vecinătatea acestuia au fost portocalii. Cercetările au fost continuate cu calus de *Arabidopsis*, care, în regim de subcultură, a fost transferat pe medii de bază în care au fost introduși regulatorii de creștere folosiți în experimentul precedent. Spre deosebire de calusul de morcov, care a fost de culoare verde, calusul de *Arabidopsis* a fost opalescent, lăptos; pe mediu cu 2,4-D calusul a fost friabil, în timp ce pe mediu cu procaină acesta a fost de consistență mijlocie, iar pe mediu cu dietilaminoetanol el a fost rigid și compact.

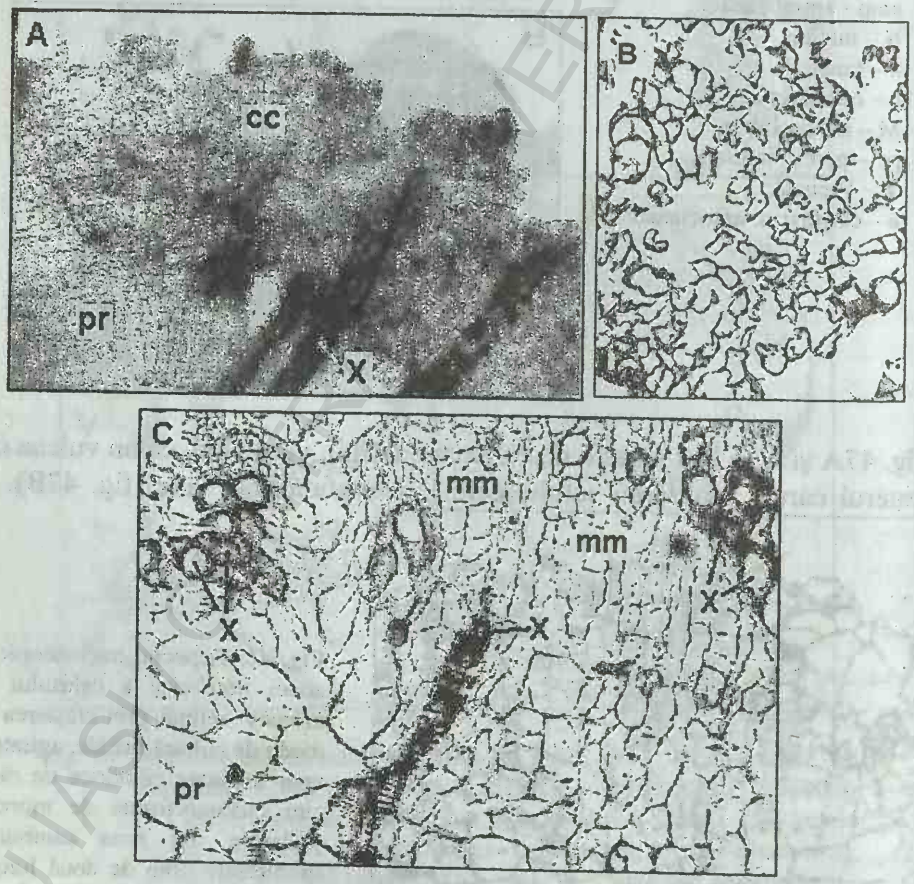


Fig. 47. Aspectul microscopic al calusului de morcov obținut prin creșterea pe medii agarizate ce conțin 2,4-D 2 mg/l. A – *crater* de perenchim radicular ce elaborează celule de calus; B – celule de calus lax, friabil; C – zonă de calus dens cu celule meristematice și cu elemente de xilem (cc – celule calus proliferativ; X – elemente de xilem; pr – parenchim radicular; mm – meristem proliferativ)

Deci, calusul atât în cultura primară, cât şi în subcultură, la variaţi regulatori de creştere prezenţi în mediul de cultură, morfostructural a avut o comportare diferită. În general, calusul generat din fragmente de organe verzi este verde; celulele lui, conţinând clorofilă, poate fi fotomixotrof. Calusul regenerat din rădăcini, hipocotile, antere (mai ales ţinut la întuneric), fie este nepigmentat, fie are o culoare galben-pală, ori crem, este heterotrof. Calusul generat din rădăcini de morcov (ca de altfel şi alte tipuri de calusuri) se pot înverzi, cromoplastele sau amiloplastele transformându-se în cloroplaste. Adeseori, culoarea de la suprafaţa calusului diferă de aceea a calusului din profunzime; totodată, pe suprafaţa calusului pot exista arii morfogene, diferite ca structură şi culoare, de la o zonă la alta. Zonele cu centre meristematice, caulogene sau embriogene, sunt de culoare intens verde, în raport cu culoarea verde pală, sau albinotică, a marei mase a suprafeţei calusului. Se cunosc şi situaţii în care calusul, ca şi tulpinile şi frunzuliţele unor vitroplantule, poate să se *vitrifice* (călus *hiperhidric*), uneori fiind şi anergic, situaţie în care el are aspect sticlos, nodulos sau spumos, proliferativ, dar lipsit de morfogeneză (fig. 48A şi B).

Uneori, culoarea suprafeţei calusului poate fi roşie-vişinie, datorită prezenţei antocianilor în sucul vacuolar al celulelor situate la suprafaţa acestuia. *Gautheret* şi *Nobécourt* au semnalat prezenţa antocianilor şi în coloniile celulare de morcov, iar *Morel* în cele de viţă-de-vie şi de *Cissus discolor* (*Gautheret*, 1959). Un conţinut foarte ridicat în antociani se află în calusul de *Haplopappus* sau în unele calusuri de *Rosa*, *Forsythia* (*Bader* şi colab., 1982), şi altele. Formarea şi acumularea antocianilor în celulele calusului depinde de o multitudine de factori: *specie*, *proveniența* şi *vârsta* calusului, *natura* inoculului care s-a aflat la baza iniţierii calusului, *condiţiile de cultură* etc. Prin transferarea calusului cu antociani într-un mediu lichid, suspensiile celulare generate din acesta vor avea un conţinut mai scăzut în antociani, decât cel avut de celulele calusale (după *Street*, 1973). *Gautheret* (1959) a constatat că anaerobioza inhibă formarea şi acumularea de antociani în celulele calusului. În schimb, prezenţa luminii – îndeosebi a luminii violete, albastre şi a celei verzi – intensifică formarea antocianilor în sucul vacuolar al celulelor calusale (*Slabecka-Szweykowska*, 1955-1959); dar, în unele cazuri, acumularea antocianilor în celulele calusului poate fi înregistrată şi în regim de întuneric. *Regulatorii* de creştere, concentraţia şi *natura* acestora, sunt factori care pot şi ei influenţa sinteza de antociani. După *Street* (1977b), auxinele inhibă, iar citochininele stimulează acumularea antocianilor în sucul vacuolar. Pe de altă parte, s-a constatat că *frigul*, *carența în azot* sau bogăţia mediilor în *glucide* (îndeosebi în zaharoză) sunt tot atâţia factori care pot stimula elaborarea de antociani în celule. Alteori,

conținutul ridicat de NaCl în substratul de cultură, la anumite specii și tipuri de calusuri vegetale, poate stimula acumularea de antociani în vacuolele celulelor calusale, superficiale.

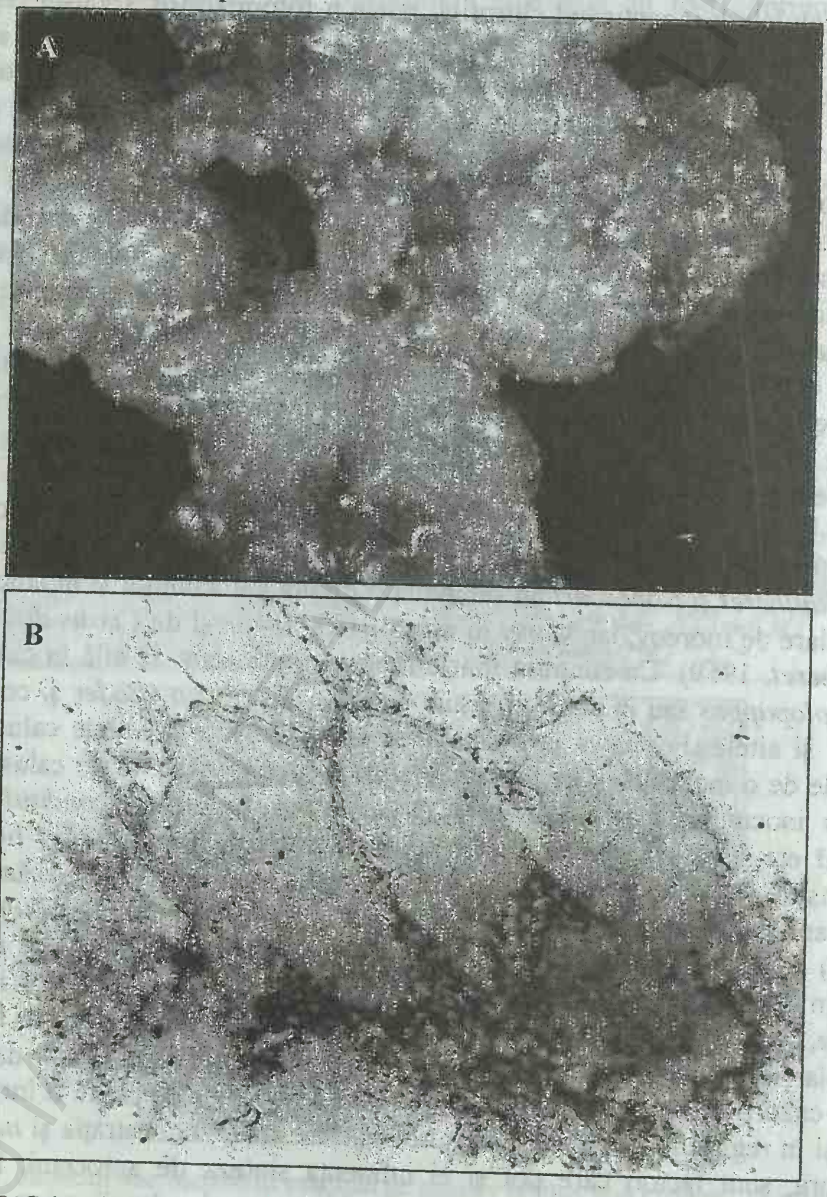


Fig. 48. Calus vitrificat, sticlos, noduros, aspect macroscopic (A); B – secțiune prin zona nodulară a calusului vitrificat cu evidențierea unor structuri laxe, lipsite de centre organogene

Culoarea cenuşie sau bej-brună a calusului dovedeşte o intrare a acestuia în senescenţă; de cele mai multe ori, schimbarea culorii calusului în brun închis dovedeşte o stare de necroză. Dar, la calusul de *Rubus fruticosus* moartea celulelor calusale este însoţită, dimpotrivă, de o decolorare completă a acestuia (*Gautheret*, 1959).

Din cele prezentate, rezultă faptul că în zonele traumatizate, acolo unde leziunea nu este în apropierea unor meristeme, dar se află în imediata vecinătate a unor ţesuturi, cum sunt cele ale periciclului sau ale liberului, sub acţiunea şocului de rănire acestea – după *dediferenţiere* – dobândesc capacitatea de a se multiplica. Ulterior, la nivelul celulelor regenerate din neomeristeme se declanşează capacitatea de diferenţiere şi aptitudinea de morfogeneză; la butaşi această aptitudine morfogenă dobândită se exprimă prin neogeneză de rădăcini adventive. Amploarea rizogenezei va depinde de specie, de mărimea rănii (ca întindere şi profunzime), de starea fiziologică a butaşului, de prezenţa în apropierea zonei traumatizate a unor bogate rezerve nutritive, precum şi de migrarea în zonă a fitohormonilor. În înmulţirea vegetativă de amploare, ca de altfel şi în micropropagare, rezervele fitohormonale endogene sunt suplimentate cu preparate rizogene, administrate exogen.

Din punct de vedere fiziologic, *Nabors* şi colaboratorii (1982) a distins două tipuri de calus, şi anume: un calus de tip *regenerativ* (CR), care întotdeauna poate da naştere la vitroplantule, şi un calus de tip *neregenerativ* (CN), ce creşte luxuriant, din el diferenţiindu-se rădăcini şi, uneori, muguraşi, dar niciodată plantule. Ţesutul calusal poate fi *embriogen* sau *neembriogen*. Calusul embriogen (regenerativ) este optic dens (opac) şi compact, mai rar translucid, de culoare alb-lăptoasă, spre galben, ori galben-verde. Pe suprafaţa acestui tip de calus pot fi remarcate, pe alocuri, zone compacte, cu celule nediferenţiate şi nevascularizate, care pot genera embrioni sau embrioizi, formaţiuni din care se pot dezvolta, ulterior, vitroplantule. Aceste zone alternează cu arii mai plate şi mai omogene, constituite din calus neembriogen ce este alcătuit dintr-un ţesut opalescent, albinotic sau verde-pal, ori bej-brun. Calusul neembriogen prezintă o consistenţă mai laxă, este friabil şi se dezmembrează uşor în mici conglomerate de celule, cu celule mari, care au un vacuom foarte extins.

Nabors a fost primul care a dovedit faptul că cea mai ridicată capacitate generativă, menţinută timp îndelungat (mai mult de un an), cu tendinţa de a fi pierdută în condiţiile cultivării lui pe un mediu impropriu conservării aptitudinii morfogene, o prezintă calusul *embriogen*, denumit şi calus de tip *regenerativ*. Trecerea calusului regenerativ, în neregenerativ, respectiv în calus neembriogen, este un proces definitiv, cele două forme sau tipuri de calusuri, diferite din punct de vedere fiziologic, nu sunt *interconvertibile*.

De altfel, la cele două tipuri de calusuri impulsionarea şi susținerea creşterii şi a diferențierii celulare, precum şi declanşarea proceselor de morfogeneză, necesită imperativ prezența în mediile de cultură a unor regulatori de creştere, aplicați în doze variate, diferiți de aceia utilizați până în acel moment. De regulă, calusurile neregenerative manifestă o creştere ambundentă, în timp ce calusurile regenerative au o creştere lentă, chiar şi pe mediile cele mai potrivite susținerii proliferării celulelor lor. Pentru obținerea unui calus regenerativ cât mai omogen, sau cel puțin a unui calus în care masa calusală, aptă de embriogeneză, să fie predominantă, este de dorit să se preîntâmpine dezvoltarea neomogenă a calusului. Dar, *Nabors* a remarcat şi faptul că, la un moment dat, într-un anumit stadiu de dezvoltare a calusului de tip neregenerativ (neembriogen), spontan, în masa acestuia pot să se formeze regiuni regenerative, nodulare, compacte, care izolate şi subcultivate pot deveni, ulterior, calus cu capacități morfogene.

Vasil şi *Vasil* (1981) au căutat, fără succes, să identifice criterii şi metode citofiziologice certe de localizare timpurie, în calus, a zonelor embriogene. Întrucât acest fapt nu a fost posibil, autorii citați au considerat că numai bogata experiență şi intuiția experimentatorului îl poate conduce pe acesta la sesizarea şi decelarea zonelor de calus regenerativ, embriogen, pe fondul general al țesutului calusal neembriogen. În consecință, trebuie făcute cercetări asidui în direcția selectării celor mai corespunzătoare medii de cultură, care să favorizeze formarea cu precădere a calusului de tip regenerativ sau embriogen şi care, adeseori, pot fi diferite compozițional, în cazul vitroculturilor de calus provenite din variate tipuri de explante sau de genotipuri. Frecvent, cele mai bune medii de cultură, adecvate creşterii optime a țesutului calusal, nu sunt şi cele mai corespunzătoare pentru inițierea sau proliferarea calusului de tip regenerativ. În general, pentru calusul de tip regenerativ sunt de preferat mediile sărace în azot (redus sau oxidat), cu pH 5,5, cum este cazul mediului *Linsmaier-Skoog* (1965), sau a mediilor cu o compoziție chimică asemănătoare acestuia. La speciile de cereale se recomandă adăugarea în mediul de cultură a 2,4,5-T-ului (regulator de creştere de tip auxinic), în concentrații mici (de 5.10^{-5} M), ce exercită un efect pozitiv asupra susținerii creşterii masei calusale, dar care nu este potrivit pentru inducerea şi menținerea proceselor regenerative. La calusul de *Pennisetum typhoides* o capacitate regenerativă maximă a fost atinsă la o balanță hormonală constituită dintr-un *amestec* de trei regulatori de creştere, respectiv a 1 mg/l 2,4,5-T, cu 1 mg/l AIA, şi un adaos de 0,5 mg/l chinetină. Există însă o mare variabilitate de reacție a calusului în funcție de genul plantei, iar în cadrul genului, de la specie la specie şi în cadrul speciei, de la soi la soi.

La cereale, în general, calusul generat din rădăcinițe de plantule posedă mai multe centre cu calus de tip regenerativ, în raport cu calusul derivat din embrioni imaturi. Dar, şi în astfel de cazuri, calusul regenerativ (embriogen) reprezintă numai aproximativ 1-10% din totalul masei calusale. Dacă regiunile cu calus de tip regenerativ sunt trecute pe medii menite să impulsioneze şi să susțină procesele regenerative, celulele lui vor da naştere, în final, la plantule. Până în prezent, însă, nici un tip de mediu de cultură nu a putut fi găsit ca inductor al formării de plantule, în zonele de calus neembriogen (neregenerativ).

În general, s-a constatat că inoculii cultivați la întuneric generează mai mult calus, în comparație cu cei crescuți la lumină. La nivelul calusurilor crescute la întuneric, regiunile cu calus regenerativ sunt mai greu de depistat, dar, procentul de incidență a formării de calus de tip regenerativ este mai ridicat. Calusul de grâu trebuie subcultivat, la intervale de cinci săptămâni, pe mediu potrivit inducției şi diferențierii de plantule, fie susținerii diviziunii şi creşterii celulare. Pe un astfel de mediu, calusul de tip regenerativ nu va mai creşte şi în circa 2-5 săptămâni va genera vitroplantule.

Dacă calusul are o alcătuire mixtă, componenta neregenerativă creşte mai intens decât cea regenerativă; din porțiunile de calus de tip regenerativ se vor diferenția şi vitroplantule. După operarea de repetate pasaje ale calusului de tip regenerativ, pe medii lipsite de regulatori de creştere, potrivite inducerii neogenezei de vitroplantule, se recomandă transferarea calusului pe un mediu cu auxină, pentru reamorsarea proceselor de creştere ale acestuia.

Vitroplantulele neoformate la nivelul calusului, pot fi transferate *ex vitro*; tulpinițele lipsite de rădăcinițe, sau propaguli vor fi detaşate de calus şi vor fi tratate cu preparate rizogene – ca oricare butaş – urmând a fi amplasate în tăvi ce conțin un substrat steril (de exemplu perlită), umidificat cu apă de robinet. Culturile vor fi protejate cu sisteme de acoperire, pentru evitarea deshidratării acestora. După 1-2 săptămâni, plantulele bine înrădăcinate pot fi transferate în ghivece umplute cu pământ nesterilizat, în amestec cu 25% perlită, cu sau fără turbă, şi vor fi crescute în camere climatizate sau în sere, preferabil la temperatura de 25-27^{0}C; culturile în perlită, periodic, vor fi udate cu soluții nutritive.

Deci, în funcție de scopul urmărit se va acorda o mare atenție *alegerii materialului vegetal* din care se va efectua prelevarea de explante, chiar şi pentru inițierea unei culturi de calus, întrucât de componența tisulară a inoculilor şi de proveniența lor, calusul, odată obținut, poate deține calități variate, în vitrocultură el prezentând evoluții particulare.

Calusul sau suspensiile celulare, derivate dintr-o cultură de calus friabil, pot servi şi la practicarea stresselecţiei, în regim de vitrocultură. Alegerea tipului de mediu de cultură se va face în dependenţă de scopul avut în vedere. Astfel, atunci când se doreşte inducerea toleranţei la un anumit agent stresant (sărăturare, fitotoxină, pesticide etc.), calusul (primar, sau rezultat din subcultură), poate avea utilizări variate, constituindu-se într-un material biologic asupra căruia se pot exercita, cu succes, presiuni de selecţie, cu diferiţi agenţi, în scopul izolării de linii rezistente la variaţi factori. *Nabors* (1982), împreună cu colectivul său, a reuşit să regenereze plante rezistente la sărătură, din calus cultivat pe medii de cultură cu conţinut crescător de NaCl. Pe această cale, el a regenerat plante de *Triticum*, *Orisa* şi *Pennisetum*, tolerante la concentraţii de 3.000, 6.000 şi 9.000 mg/l NaCl, în substratul de cultură; la *Avena* pragul de suportabilitate la NaCl, în mediul de cultură, s-a putut ridica numai până la concentraţia de 350 mg/l. Vitroselecţia a fost practicată de *Nabors* şi la tomate, porumb, salată, sfeclă de zahăr, soia etc., şi a obţinut, din linii celulare, regenerarea de plante rezistente la secetă, la *pesticide*, sau la exces de ioni de *aluminiu* şi de *mangan*, în sol. La grâu, calusul care a răspuns pozitiv la astfel de tratamente s-a dovedit a fi acela obţinut din rădăciniţă embrionară, generat în condiţiile germinării cariopselor mature pe medii aseptice cu aport de 2,4-D. Pentru aceasta, boabele de grâu au fost sterilizate, timp de câteva secunde, în etanol 90^0; apoi, asepsizarea acestora a continuat cu trecerea cariopselor într-o soluţie de hipoclorit, timp de 30 minute (în cazul în care contaminarea tegumentelor era puternică, *Nabors* a recomandat tratarea boabelor cu o soluţie de clorură mercurică 0,02-100%, timp de 1-3 minute). În general, în asepsizarea seminţelor este de preferat utilizarea unor tratamente de mai scurtă durată, cu concentraţii mai ridicate de clorură mercurică, pentru a se preîntâmpina pătrunderea substanţei asepsizante în profunzimea tegumentelor, mercurul inhibând germinarea cariopselor şi creşterea calusului. În final, cariopsele se spală, de repetate ori, cu apă distilată, sterilă, pentru îndepărtarea agenţilor dezinfectanţi de pe suprafaţa materialului vegetal.

Atunci când se urmăreşte cultivarea *in vitro* a embrionilor imaturi, boabele de grâu pot fi dezinfectate după o procedură asemănătoare, prin efectuarea de tatonări; din cariopsele sterilizate, degajarea embrionilor se operează în regim aseptic, la un stereomicroscop (amplasat în hota aflată în funcţiune), prin disecarea şi îndepărtarea pericarpului în zona de localizare a embrionului, evitându-se – pe cât posibil – lezarea acestuia.

Cariopsele sau embrionii se recomandă să fie inoculaţi pe un mediu *Linsmaier-Skoog* (1965), conţinând macro- şi microelemente, vitamine, 4% zaharoză, agar-agar şi 2,4-D (ori 2,4,5-T), în concentraţie de 1 până la 10 mg/l.

Agentul stresant la care dorim să obţinem toleranţă, poate fi încorporat fie în substratul de cultură, preparat pentru inducerea formării de calus, fie acesta poate fi adăugat în mediul de subcultură, mediu destinat repicării calusului produs în absenţa agentului stresant. În cazul în care iniţierea calusului s-a făcut dintr-o varietate rezistentă în mod natural la acţiunea dăunătoare a unui agent stresant, ales să exercite presiune de selecţie, se poate realiza, în regim de vitrocultură, o scurtare a duratei de obţinere a unei linii rezistente la prezenţa în mediu a acelui agent sau factor de selecţie, caracterele dobândite fiind transmisibile şi la descendenţi. Stabilitatea caracterelor dobândite, cum ar fi toleranţa la un anumit factor sau concentraţie de fitotoxină, va fi dependentă de durata în care s-a petrecut imprimarea şi selectarea caracterelor de rezistenţă, respectiv timpul scurs pe parcursul operaţiunii de selecţie. Pentru a fi atinsă o toleranţă stabilă, chiar şi în absenţa îndelungată a agentului stresant, selectant, din mediul de cultură, sunt necesare cel puţin şase luni de "călire" a calusului la mediul de selecţie, prin operarea periodică de repicări succesive, pe mediu în care factorul selectant a fost prezent. În această perioadă pot să apară manifestări de producere diferenţiată a calusului de tip regenerativ sau neregenerativ.

Calusul poate fi utilizat şi ca instrument de cercetare în experimente de fiziologie, în studierea unor probleme de morfogeneză, în urmărirea unor modificări ultrastructurale în funcţie de variaţi factori, în analize de ordin biochimic etc., sub acţiunea unor factori exogeni, a unor condiţii de cultură, în dependenţă de natura inoculilor din care a provenit calusul etc. În consecinţă, calusul poate fi utilizat ca monitor (indicator) în studierea reacţiilor celulelor vegetale aflate în vitrocultură, la o serie de substanţe sau condiţii de cultură, urmărindu-se: creşterea (sub influenţa unor regulatori de creştere), respiraţia, morfo- şi organogeneza, viabilitatea, biogeneza unor produşi primari sau secundari de metabolism, cercetări de enzimologie etc. Calusul *in vitro* poate să se constituie şi într-un obiect de studiu, care să servească la descifrarea diferitelor ipostaze fiziologice, biochimice şi citologice legate de *cancerul* la plante, mai ales prin vitroculturi de calus vitrificat (hiperhidric) sau habituat.

Gautheret, în anul 1980, cu ocazia unei sesiuni speciale a Academiei Agricole Franceze, dedicată analizării aspectelor referitoare la: "*Metode moderne de multiplicare vegetativă*", a specificat faptul că, studiile referioare la proliferarea celulară şi la evoluţia celulelor postmitoză, după anii '70 au urmat un curs exploziv, ajungându-se, treptat, la o mai profundă cunoaştere a mecanismelor implicate în diviziunea şi diferenţierea celulară, în organogeneză, dar şi în pierderea acestor capacităţi.

BIBLIOGRAFIA capitolelor 1 - 4

Agricell Report. A plant tissue culture, newsletter (ed. Herman, E.B.), revue published by Agritech Consultants, Inc. SUA.

Anghel, I., 1988, *Inginerie genetică – note de curs*, Tipografia Univ. Bucureşti.

Anghel, I., (ed.), 1994, *Proceding of the 8-th National Symposium of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Ed. Univ. Bucureşti.

Anghel, I., Brezeanu, A., Cachiţă, C.D., (ed.), 1993, *Lucrările celui de al V-lea Simpozion Naţional de Culturi de Celule şi Ţesuturi Vegetale*, Bucureşti, Ed. Univ. Bucureşti.

Ardelean, A., Bolba, D., 1999, Istoricul culturilor de celule şi ţesuturi vegetale, în România. În: *Culturi in vitro la cormofite. Lucrările reunite ale* Simpozioanelor Naţionale VII şi VIII de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale (Arad-1997 şi Buziaş-1998, ed. Cachiţă, C.D., Ardelean, A., Crăciun, C.). Ed. Risoprint, Cluj-Napoca.

Augé, R.J., Beauchesne, G., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Minier R., Morand, J.Cl., Oudin, Y.,Vidalie, H., 1982, *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Lavoisier/Bailliere, Paris.

Badea, E.M., Raicu, P., 1984, Hibridarea somatică prin fuziunea protoplaştilor. În: *Culturi de celule şi ţesuturi vegetale - aplicaţii în agricultură*. Ed. Ceres, Bucureşti, cap.IV p. 189-220.

Badea, E.M., Săndulescu, D., 2001, *Biotehnologii vegetale*, Ed. Fundaţia BIOTECH, Bucureşti.

Bader, S.M., Cachiţă, C.D., Crăciun, C., 1981, Modificări ultrastructurale în vacuolele celulare ale explantelor de *Forsythia*, cultivate "in vitro". În: *Culturile de ţesuturi, instrument de cercetare în biologia vegetală teoretică şi practică. Lucrările Primului Simpozion de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale* (ed. Preda, V., Puia, I., Cachiţă, C.D.), Cluj-Napoca, Tipo Agronomia Cluj-Napoca, p. 413-422.

Bader, S.M., Cachiţă, C.D., Crăciun, C., 1982, Ultrastructure of *Forsytia suspensa* callus cells obtained from young shoot culture, În: *Plant Tissue Culture, Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture* (ed. Fujiwara,A.), Tokyo, 1982, p. 47-48.

Bajaj, Y.P.S.,1991a, Automated micropropagation for en masse production of plant. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol.17. *High-tech and micropropagation* I (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 3-16.

Bajaj, Y.P.S., 1991b, Storage and cryopreservation of in vitro culture. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol.17. *High-tech and micropropagation* I (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 361-381.

Ball, E., 1946, Development in sterile culture of stem tip subjacent regimes of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus majus* L. Am J Bot. 33, p. 301.

Beauchesne, G., 1979, Travaux menés au C.N.R.S.I.N.R.A. d'Angers; Journée d'information sur la multiplication *in vitro*. *Institut technique interprofessionnel de l'Horticulture: Service national d'appui au développement Horticole*, p. 11-17.

Beauchesne, G., 1980, Intérêt de la culture *in vitro* pour la multiplication végétative. In: *Méthodes modernes de multiplication végétative*. Comp. Rend. des Séan de l'Académie d'Agriculture de France, t.65, nr. 8, p. 638-649.

Bergmann, L., 1960, Growth and division of single cells of higher plants *in vitro*. J. Gen. Physiol. 43, p. 841.

Bergmann,L., 1967, Wachstum gruner Suspensionkulturen von *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" mit CO_2 als Kohlenstoffquelle. Planta, 74, p. 243-249.

Berlyn, M.B., Zelitch, I., 1975, Photoautotrophic growth and photosynthesis in tobacco callus cells. Plant Physiol., 56, p. 752-756.

Berthelot, A., 1934, Nouvelles remarques d'ordre chimique sur le chois des milieux de culture naturels et sur la manière de formuler les milieux synthétiques. *Bull. Soc. chim. biol.* Paris, 16, p. 1553.

Bhojwani, S.S., Razdan, M.K., 1983, *Plant Tissue Culture Theory and Practice. Developments in Crop Science.* Elsevier Amsterdam.

Bigot, C., 1980, Quelques aspects de la néoformation spontanée de bourgeons. In: *La multiplication végétative des plantes supérieures* (ed. Chaussat, R., Bigot, C.), Gauthier – Villars, Paris, p. 77-97.

Biondi, S., Thorpe, T.A., 1981, Requirements for a tissue culture facility. In: *Plant Tissue Culture. Methods and Apllications in Agriculture* (ed. Thorpe, T.A.). Academic Press, New York, p.1-20.

Boulay, M., Chaperon, H., David, A., Faye, M., Isemukoli, K., Durand, R., Boudet, A.M., Frondot, A., Rancillac, M., 1979, *Micropropagation d'arbres forestiers. Etudes de Recherches*, AFOCEL 12, p. 6.

Bourgin, J.P., Nitsch, J.P., 1967, Obtention de *Nicotiana* haploîdes à partir d'étamines cultivées *in vitro*. Ann. Physiol. Vég. 9, p. 377-382.

Boxus, Ph., 1992, Mass propagation of strawberry and new alternatives for some horticultural crops. In: "*Transplant Production Systems*" (ed. Kurata, K., Kozai, T.), Kluver Academic Publisher, Dordrecht, (The Netherlands), p. 151-162.

Boxus, Ph. and **Druat.**, 1985, Mass propagation of fruit trees in in vitro techniques. În: *Propagation and Long Term storage* (ed. Schcifer-Menuhr, A.), Martinus Nijhoff and Junk, Dordrecht, Boston, Lancaster, p. 29-33.

Boxus, Ph., Quoirin, M., 1974, La culture de méristèmes apicaux de quelques espèces de Prunus. *Bu''. Soc. roy. Bot. Belg.* 107, p. 91-101.

Boxus, P., Jemmali, A., Piéron, S., 1995, Multiplication végétative-la micropropagation. In: *Biotechnologies végétales* (ed. *Demarly Y., Picard, E., Boxus, P.*) CNED, Inst. de Rennes, Franţa, p. 5-116.

Brainerd, K.E., Fuchigami, L.H., 1982, Stomata functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA, and CO_2. J. Exp. Bot. 33. p. 388-392.

Braun, A.C., 1941, Development of secondary tumors and tumor strands in the crown-gall of sanflowers. Phytopatol., 31, p. 135-149.

Braun, A.C., 1954, The physiology of plant tumors. Ann. Rev. Plant Physiol., 5, p. 133-162.

Braun, A.C., 1962, Tumor inception and development in the crown-gall disease. Annu. Rev. Pl. Physiol. 13, p. 533.

Braun, A.C., Lipetz, U., 1966, The use of tissue cultures in phytopathology. In: *Cells and Tissues in Culture* (ed. Willmer, E.N.), Vol.3, New York: Academic Press, p.691-722.

Brezeanu, A., 1984, *Progrese in domeniul folosirii protoplaştilor în cercetarea biologică. Protoplaştii*, Tipo. Univ. Bucureşti.

Bridgen, M.P., Staby, G.L., 1983, Protocols of low-pressure storage. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1 (ed. Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., Yamada, Y.) Macmillan, New York, p. 816-825.

Brochard, P., 1985, Use of MILAP substrates for *in vitro* rooting and coming out of plants obtained by micropropagation. Acta Hortic 212, p. 322-323.

Brochard, P., 1991, Use of artificial substrates for *in vitro* propagation. In: "*Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol.17. *High-tech and Micropropagation* I" (ed. Bajaj Y.P.S.), Springer Verlag, Berlin, p. 270-284.

Buchala, A.J., Schmid, A., 1979, Vitamin D and its analogues as new class of plant growth substances affecting rhizogenesis. Nature (London), 280, p. 230-231.

Cachiţă, C.D., 1978, Cytological modification induced by procaine in the cultures of vegetal tissues. Trav. Mus. Hist. Nat."Grigore Antipa", Bucureşti, XIX, p. 21-23.

Cachiţă, C.D., 1980 a, Creşterea şi diferenţierea meristemelor caulinare de *Dianthus caryophylus var.Linda*, în cultură aseptică. St. şi Cerc. Biol., ser. Biol. veg., 32, 1, p. 63-68.

Cachiţă, C..D., 1980 b, Înmulţirea meristematică a orhideelor şi cercetarea modificării activităţii peroxidazice în protocormul de *Cymbidium* sub influenţa acidului beta indolilacetic şi a procainei. Contrib. Bot., Grădina Botanică a Univ. "*Babeş-Bolyai*" Cluj, p. 219-229.

Cachiţă, C.D., 1983, Contribuţii la tehnica de multiplicare şi propagare "in vitro" a orhideelor. În: *Lucrările celui de al II-lea Simpozion Naţional de Culturi de Ţesuturi Vegetale "in vitro"* (ed. Ceauşescu, I.), Piteşti-Mărăcineni, (Ed. Acad. Şt. Agr. şi Silv.) Bucureşti, 1, p. 191-198.

Cachiţă, C.D., 1984, Tehnica cultivării *in vitro* a celulelor şi ţesuturilor vegetale. În : *Culturi de celule şi ţesuturi vegetale – aplicaţii în agricultură*. Ed. Ceres, Bucureşti, cap. I, p. 7-94.

Cachiţă, C.D., 1987, *Metode in vitro la plantele de cultură – baze teoretice şi practice*, Ed. Ceres, Bucureşti.

Cachiţă, C.D., (ed.), 1990, *In Vitro Explant Cultures, Present and Perspective. The IV-th National Symposium on Plant Cell and Tissus Culture*, 1989, ICB Cluj-Napoca, Ed. Tipocart Braşov.

Cachiţă, C.D., 1991, The Effect of Nature and Origin of Explant on Micropropagation. În: *Biotechnology in Agriculture and Foresty*. Vol. 17. *High-Tech and Micropropagation* I (ed. Bajaj Y.P.S.), Springer-Verlag Berlin, p.142-167.

Cachiţă, C.D., Ardelean, A., 1996, *Procaina – bioefector la om, plante şi animale*, Ed. Mirton, Timişoara.

Cachiţă, C.D., Ardelean, A., (ed.), 2002, *Omagiu dedicat lui G. Haberlandt (100 de ani de la lansarea teoriei totipotenţialităţii celulei vegetale) şi lui Morel şi Martin (50 de ani de la realizarea de vitroculturi libere de viroze)*. În: *Lucrările celul de al XI-lea Simpozion Naţional de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale*, 2000, Cluj-Napoca, Ed. Daya Satu Mare.

Cachiţă, C..D., Crăciun, C., 1980, The Ultrastructure of carnation callus originating in a meristem grown in media with varied hormonal composition. Trav. Mus. Hist. Nat. "Grigore Antipa", Bucureşti, XXII, p. 51-54.

Cachiţă, C.D., Crăciun, C., 1990, Ultrastructural Studies on Some Ornamentals. În: *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 5. *Ornamental Species* (ed. Ammirato, Ph.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Bajaj, Y.P.S.), McGraw.Hill, Publ. Co.SUA., p. 57-94.

Cachiţă, C.D., Crăciun, C., 1991, Vitrification and stress in carnation plantlets transferred from vitro, *ex vitro*. Ultrastructural aspects. In: *In vitro Explant Cultures, Present and Perspective. The IV-th National Symposium on Plant Cell and Tissue Culture* 1989 (ed. Cachiţă, C.D.), ICB Cluj-Napoca, Ed. Tipocart Braşov.

Cachiţă, C.D., Crăciun, C., 1995, Cryopreservation of Alfalfa (*Medicago sativa* L) and Clovers (*Trifolium species*). În: *Biotechnology in Agriculture and Foresty*. Vol. 32.

Cryopreservation of Plant Germplast I (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag Berlin, p. 280-292.

Cachiţă, C.D., Honès, J .1976, L'influence de la procaine sur la croissance des tissus végétaux cultivés "in vitro". Bull. soc. roy. Bot. Belg., 109, p. 347-353.

Cachiţă, C.D., Lazăr, M., 1983, Diferenţierea de plantule din explante nodale sau din boboci de Freesia. În: *Lucrările celui de al II-lea Simpozion Naţional de Culturi de Ţesuturi Vegetale "in vitro"* (ed. Ceauşescu, I.), Piteşti-Mărăcineni, 1, p. 204-213.

Cachiţă, C.D., Halmágy, A., 1999, Comportamentul protocormilor de *Cymbidium* în urma stocării lor timp îndelungat sub un strat de ulei de parafină. În: *Culturi in vitro la cormofite* (ed. Cachiţă, C.d., Ardelean, A., Crăciun, C.), Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, p. 276-281.

Cachiţă, C.D., Petrescu, C., 1985, *Curs practic de culturi de ţesuturi in vitro cu aplicaţii în legumicultură şi floricultură.* Institutul Agronomic "N. Bălcescu", Bucureşti.

Cachiţă, C.D., Sand, C., 2000, *Biotehnologie vegetală*, Ed. Mira Design, Sibiu.

Cachiţă, C.D., Ardelean, A., Crăciun, C. (ed.), 1997, *Actualităţi şi perspective în biotehnologiile vegetale. Lucrările celui de al VI-lea Simpozion Naţional de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale*, 1996, Băile Felix-Oradea, Ed. "V. Goldiş" Arad.

Cachiţă, C.D., Ardelean A., Crăciun, C., (ed.), 1999, *Culturi "in vitro" la cormofite.* În: *Lucrările reunite ale Simpozioanelor Naţionale VII şi VIII de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale* (1997 Arad şi 1998 Buziaş), Ed. Risoprint Cluj-Napoca.

Cachiţă, C.D., Bavaru, A., Brezeanu, A. (ed.), 2000, *Actualităţi şi perspective în biotehnologia vegetală. Lucrările celui de al IX-lea Simpozion Naţional de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale,* 1999, Constanţa, "Ovidius" University Press.

Cachiţă, C.D., Lazăr, M., Grigoraş, St., 1985, Morfogeneza la nivelul inoculilor constând din rahis şi boboci de *Freesia hybrida.* În: *Lucrările celui de al lll-lea Simpozion Naţional de Culturi de Celule şi Ţesuturi Vegetale* (ed. Ceauşescu, I., Anghel, I., Brezeanu, A.), Bucureşti, p. 431-436.

Cachiţă, C.D., Osv àth, T., Pamfil, C, 1979, Terminologie biologică în domeniul culturilor de ţesuturi vegetale. Contrib. Bot. Grădina Botanică a Univ. "*Babeş-Bolyai*" Cluj, p. 252-257.

Cachiţă, C.D., Achim, Fl., Cristea, V., Gergely, M., 1985, Organogenic effect of 2-chloroethylphosphonic acid on different types of vegetal explants cultivated "in vitro". Evolution and Adaptation. Univ. "Babeş-Bolyai", Cluj-Napoca, vol. II., p. 215-220.

Cachiţă, C.D., Achim, Fl., Cristea, V., Gergely, K., 1987, 2- chloroethylphosphonic acid and morphogenesis. Symposium Florizel 87 Arlon-Belgium, p. 234-246.

Cachiţă,C.D., Achim, Fl., Vârban, N., Taloş, I., 1986, Organogeneza sub influenţa acidului 2-cloroetilfosfonic la inoculii cultivaţi "in vitro".III.Meristeme de garoafe. Prod.veg.-Horticultura, 10, p. 30-33.

Cachiţă,C.D., Cristea, V., Achim, Fl., Gergely, K., 1985, Acţiunea acidului 2-cloroetil-fosfonic asupra inoculilor cultivaţi "in vitro". În: *Lucrările celui de al III-lea Simpozion Naţional de Culturi de Celule şi Ţesuturi Vegetale*, Bucureşti, p. 463-473.

Cachiţă, C.D., Cristea, V., Gergely, K., Taloş, I., 1986, Organogeneza sub influenţa acidului 2-cloroetilfosfonic la inoculi cultivaţi "in vitro".I.Protocorm de *Cymbidium.* Prod.veg.-Horticultura, 6, p. 36-39.

Cachiţă, C.D., Cristea, V., Taloş, I., Gergely, K., 1986, Organogeneza sub influenţa acidului 2-cloroetilfosfonic la inoculii cultivaţi "in vitro". II. Organogeneza la nivelul minibutaşilor de crizanteme. Prod. veg.-Horticultura, 9, p. 37-39.

Cachiţă, C.D., Gaspar, Th., Negruţiu, I., Jacobs, M., 1976, Comparative effects of 2, 4-D and procaine on morphology and peroxidase activity of carrot tissue grown *in vitro.* Me. Fac. Lendbow. Gent. Belg., 41, 2, p. 1043-1048.

Cachiță, C.D., Henegariu, O., Osvath, T., Suciu, T., 1981, Metode de multiplicare pe medii aseptice la Gerbera. În: *Culturile de țesuturi, instrument de cercetare în biologia vegetală teoretică și practică. Lucrările Primului Simpozion de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale* (ed. Preda, V., Puia, I., Cachiță, C.D.), Cluj-Napoca, p. 361-371.

Cachiță, C.D., Jacobs, M., Negruțiu, I., Gaspar, Th., 1976, Comparative effects of procaine and 2,4-D on growth and peroxidases of *Arabidopsis* callus. Med. Fac. Landbow. Rijkuniv., Gent, 41, 2, p. 1521-1526.

Cachiță, C.D., Lazăr, M., Achim, Fl., Cristea, V., Grigoraș, St., 1985, Morphogenesis at the level of explants consisting of flower-buds. "Evolution and Adaptation". Univ. "Babeș-Bolyai", Cluj-Napoca, vol. II, p. 205-213.

Cachiță. C.D., Osvath, T., Deliu, C., Andreica, A., 1981, Procedee de multiplicare "in vitro" la *Saintpaulia ionantha*. În: *Culturile de țesuturi, instrument de cercetare în biologia vegetală teoretică și practică*. Lucrările Primului Simpozion de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale (ed. Preda, V., Puia, I., Cachiță, C.D.), Cluj-Napoca, p. 351-360.

Cachiță, C.D., Rakosy-Tican, L., Ardelean, A., (ed.), 2002, *Manifestare jubiliară "25 de ani de culturi de țesuturi vegetale în România". Lucrările celui de al X-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale*, 2000, Cluj-Napoca, Ed. Risoprint Cluj-Napoca.

Cachiță, C.D., Zăpîrțan, M., Bercea, V., Cristea, V., Osvath, T., Bechiș, E., 1989, Vitrification and some morphological and biochemical modifications at carnation plantlets (14 varieties) neoformed from meristems cultivated "in vitro". În: *Colture "in vitro" e micropropagazione in ortoflorofrutticoltura*, Cesena, p. 37.

Cappelades, M., Fontarnau, R., Carulla, C., Debergh, P., 1990, Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115, p. 141-145.

Caplin, S.M., Steward, F.C., 1948, Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science* 108, p. 655.

Carlson, P.S., 1970, Induction and isolation of auxtrophic mutants in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*. Science 168, p. 487-489.

Carlson, P.S., 1973, The use of protoplasts for genetic research. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, p. 598-602.

Carlson, P.S., Smith, H.H. Dearing, R.D., 1972, Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, p. 2292-2294.

Ceaușescu, I., (ed.), 1983. *Lucrările celui de al II-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi Vegetale "In Vitro"*, Mărăcineni-Pitești, Ed. Acad. Șt. Agr. și Silv. București, vol. I și II.

Ceaușescu, I., Anghel, I., Brezeanu, A. (ed), 1985, *Lucrările celui de al III-lea Simpozion Național de Culturi de Celule și Țesuturi Vegetale*, București, Tipo. Univ. București.

Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.R., Nester, E.W., 1977, Stable incorporation of plasmid DNA into higer plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell 11, p. 267-271.

Conger, B.V., 1981, *Cloning Agricultural Plants via in vitro Techniques*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Cocking, E.C., 1960, A method for isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature, London, 187, p. 927-929.

Cole, M., 1996, Microbial contaminants and aseptic techniques in plant tissue culture. In: *Tissue Culture of Australian Plants* (ed. Taji, A.M., Williams, R.R), Univ. of England Armidale NSW, Australia, cap. 7, p. 204-239.

Cristea, V., 1999, Studii privind cunoaşterea biologiei culturilor *in vitro* fotoautotrofe provenite de la plantele superioare, Teză de doctorat, Univ. "Babeş-Bolyai" Cluj-Napoca.

Cristea, V., Deliu, C., 1993, Efectul fitohormonilor şi a zaharozei asupra inducerii şi dezvoltării calusurilor de soia, În: *Lucrările celui de al V-lea Simpozion Naţional de Culturi de Celule şi Ţesuturi Vegetale*, Bucureşti (ed. Anghel, I., Brezeanu, A., Cachiţă, C.D.), p. 297-302.

Dalton, C.C., Street, H.E., 1977, The influence of applied carbohydrates on the growth and greening of cultured spinach (*Spinacia oleracea* L.) cells. Plant Sci. Lett., 10, p. 157-164.

D'Amato, F., 1978, Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. În: *Frontiers of Plant Tissue Culture* 1978 (ed. Thorpe, T.A.), Univ. of Calgary: International Association of Plant Tissue Culture, Canada, p. 287-295.

Damiano, C., 1980, Planning and building a tissue culture laboratory. In: *Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture. Application and feasibilities*, Beltsville, Maryland, p. 93-101.

David, A., David H., Fay, M., Isemukali, K., 1979, Culture *in vitro* et micropropagation du Pin maritime. AFOCEL, *Études et Recherches*. 12. p. 33-40.

Debergh, P.C., Maene, L.J., 1981, A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Hort., 14., p. 335-345.

Debergh, P.C., Zimmerman, R.H., 1991, *Micropropagation – Technology and Application*. Kluwer Academic Publisher.

deFossard, R.A., Myint, A., Lee, E.C.M., 1974 a, A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum*) callus. Physiol. Plant. 30, p. 125-130.

deFossard, R.A., Nitsch, C., Cresswell, R.J., Lee, E.C.M., 1974 b, Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. New Zealand J. For. Sci. 4, p. 267-278.

Deliu, C., Tămaş, M., Ghiran, D., 1994, *In vitro* culture and the production of protoberberine and other alkaloids. In: *Biotechnology in Agriculture and Foresty*. Vol. 28, *Medicinal and Aromatic Plants*, VII (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.56-71.

Deogratias, J.M., 1987, Utilisation de la culture *in vitro* en vue de l'élimination des virus NRSV, PDV et CLSV chez le cerisier (*Prunus avium* L.). Thèse. Université de Bordeaux (France).

De Ropp, R.S., 1955, The growth and behaviour *in vitro* of isolated plant cells. *Proc. roy. Soc.* B. 141, p.86.

Dix, P.J., 1994, Isolation and characterisation of mutant cell lines. In: *Plant Cell and Tissue Culture* (ed. Vasil, I.K. & Thorpe, T.A.), Dordrecht,The Netherlands: Kluwer, p. 119-138.

Dodds, J.H, 1989, Tissue culture for germplasm management and distribution. In: *Strengthening Collaboration in Biotechnology: International Agricultural Research and the Private Sector* (ed. Cohen, J.I., Washington, D.C.), Bureau of Science and Technology, AID, p. 109-128.

Dodds, J.H., Roberts, L.W., 1985, *Experiments in Plant Tissue Culture*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, Anglia.

Dunwell, J.M., 1978, Division and differentiation in cultured pollen. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture* (ed. Thorpe T.), University Press, Cagary. p. 103.

Ellinger, A., 1905, Ueber die Constitution der Indolgruppe im Eiweiss. II Mittheilung: Synthese der Indol-3-propionsäure. *Ber. dt. chem. Ges.*, 38, p. 2884.

Endress, R., 1994, *Plant Cell Biotechnology*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Budapesta.

Enescu, V., Ioniță, L., Palada, N.M.,1994, *Înmulțirea vegetativă a arborilor forestieri. Metode "convenționale". Culturi de țesuturi in vitro*. Ed. Ceres, București.

Erikson, T., 1965, Studies on the growth requirements and growth measurements of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. Plant.* 18, p. 976-993.

Erikson, T., Jonasson, K., 1969, Nuclear division in isolated protoplasts from cells of higher plants grown *in vitro*. Planta, 89, p. 85-89.

Flinn, B.S., Webb, D.T., Newcomb, W., 1988, The role of cell clusters and promeristemoïds in determination and competence for caulogenesis by *Pinus strobus* cotyledons *in vitro*. Can. J. Bot. 66, p. 1556-1565.

Fuchs, Y., Chalutz, E., 1984, *Ethylene – Biochemical, Physiological and Applied Aspects*. Martinus Nijhoff / Dordrecht, Dr. W. Junk Publisher, The Hague, Boston, Lancaster.

Fujiwara, A. (ed.), 1982, *Plant Tissue Culture. Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Japan, The Japanese Association for Plant Tissue Culture, Abc Photo Printing Co., Ltd. Tokyo.

Fujiwara, K., Kozai, T., Watanabe, I., 1988, Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages, Acta Horticulturae, 230, p. 153-158.

Gamborg, O.L., 2002, Plant tissue culture. Biotechnology. Milestones, *In vitro* Plant Cellular & Developmental Biology (Official publication of the IAPTC & B). J. of Soc. *In vitro* Biology published by CABI Publ., t. 38, nr. 2, p. 84-92.

Gamborg. O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968 a, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cellular Research*, 50, p. 151-158.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968 b, Nutrient requirements of suspension cultures. Nature, 220, p. 604-605.

Gaspar, T., 1994, New growth regulators in tissue culture. Proceedings of the BPTCG autumn symposium: "New hormones in the control of Plant cell, tissue and organ culture". ULg, November 18th.

Gaspar, T., 1995, The concept of cancer in *in vitro* plant cultures and the implication of habituation to hormones and hyperhydricitiy. Plant Tissue and Culture Biotechnology, IAPTC Rev. vol. 1 nr. 3, p. 126-136.

Gaspar, T., 1998, Plants can get cancer. Plant Physiol. Biochem, 36, nr. 3, p. 203-204.

Gaspar, T., Kevers, C., Debergh, P., Maene, L., Paques, M., Boxus, P., 1987, Vitrification: morphological physiological and ecological aspects. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry* (ed. Bonga J.M., Durzan, D.J.), Vol. 1, Pub. Martinus Nijhoff, p. 152-166.

Gautheret, R.J., 1934, Culture du tissu cambial. C.R. Ac. Sc., 198, p. 2195-2196.

Gautheret, R.J., 1937, Nouvelles recherches sur la culture du tissu cambial. *C.R. Acad.* Sci., Paris 205, p. 572.

Gautheret, R.J., 1939 a, Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de Carotte. C.R. Acad.Sci., Paris 208., p. 118-120.

Gautheret, R.J., 1939 b, Action de l'acid indol-β-acétique sur les tissus du tubercule de carotte. C. R. Soc. Biol., 130. p. 7-9.

Gautheret, R.J., 1939, Sur le développement de fragments de tubercules de Chourave. C. R. Soc. Biol., 130, p. 244-247.

Gautheret, R.J., 1941, Action du saccharose sur la croissance des tissus de Carotte. C.R. Soc. Biol., Paris 135, p. 875-878.

Gautheret, R.J., 1942 a, Hétéro-auxines et cultures de tissus végétaux. Bull. Soc. Chem. Biol., Paris 24, p. 13-41.

Gautheret, R.J., 1942 b, *Manuel technique de culture des tissus végétaux*. Masson, Paris.

Gautheret, R.J., 1945, *Une voie nouvelle en biologie végétale. La culture des tissus*. Gallimard, Paris.

Gautheret, R.J., 1948, Sur la culture indéfinie des tissus de *Salix caprea*. *C R. Soc. Biol.*, Paris 142, p.807.

Gautheret, R.J., 1954, Catalogue des cultures de tissus végétaux, Rev. gén. Bot. 61, p. 672-702.

Gautheret R.J., 1959, *La culture des tissus végétaux, tehniques et realisations*, Masson, Paris.

Gautheret, R.J., 1966, Factors affecting differentiation of plant tissue *in vitro*. In: *Cell Differentiation and Morphogenesis* (ed. Beerman, W.), Amsterdam: North-Holland.

Gautheret R.J., (ed.) 1977 a, *La culture des tissus et des cellules des végétaux. Résultants généraux et rèalisations pratiques*. Travaux dédiés à la memoire de Georges Morel, Masson, Paris.

Gautheret, 1977 b, La culture des tissus et des cellules des végétaux. Masson, Paris, p. 1-261.

Gautheret R.J., 1980, La culture *in vitro*: bref aperçu historique. C.R. des Séances. L'Académie d'Agriculture de Frances, nr. special: *Méthodes modernes de multiplication végétative*, t. 65, 8, p. 621-627.

Gautheret, R.J., 1985, History of plant tissue and cell culture: A personal account. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (ed. Vasil, I.K.), New York, Academic Press, (Vol. 2, p. 1-59).

George, E.F., (ed.), 1993, *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1 – *The Technology*, Exegetics Ltd., England.

George, E.F., Puttock, D.J.M., George, H.J., 1987, *Plant Culture Media*. Pub. Exegetics.

George, E.F., Sherrington, P.D., 1984, *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Press Ltd., England.

Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., Trouvelot, A., 1989, Potentialities and procedures for the use of endomycorrhizas with special emphasis and high values crops. In: *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth* (ed. Whipps, J.M., Lumdsen, R.D., Cambridge University Press, Cambridge, (England), p. 41-45.

Grout, B.W., Price, F., 1987, The establishment of photosynthetic independence in strawberry cultures prior to trasplanting. In: Proc. Symp. *Plant Micropropagation in Horticultural Industries*, Arlon, Belgium, p.55-60.

Guha, B., Maheshwari S.C., 1964, *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature (London), 204, p. 497.

Haberlandt, G., 1902, Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber Akad Wiss Wien Math. - Naturweiss K 1. 111, p. 69-92.

Halmágyi, A., 2000, Cercetări privind reacţia cormofitoinoculilor în condiţiile conservării lor. Teză de doctorat. Univ. "Babeş-Bolyai" Cluj-Napoca.

Halperin, W., 1966, Alternative morphogenetic events in cell suspension. Am. J. Bot. 53, p. 443-453.

Halperin, W., Wetherel, D.R., 1965, Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. Nature 205, p. 519-520.

Halperin, W., Komamine, A., Matsumoto, H., 1980, Aspects of DNA, RNA and protein syntesis during somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Physiol. Plant. 49, p. 255- 260.

Halperin, W., Jensen, W.A., 1967, Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. J. Ultrastruct. Research, 18, p. 428- 443.

Halperin, W., Wetherell, D.F., 1965, Ontogeny of adventive embryos of wild carrot. Science 147, p. 756-758.

Hannig, E., 1904, Zur Physiologie phlanzlicher Embryonen. I. Über die Kultur von Cruciferen-Embryonen außerhalb des Embryosacks. Bot. Z 62, p. 45-80.

Hansen, A.J., Green,, L., 1983, Potential of ribavirin for tree fruit virus inhibition. Acta *Hortic.* 130, p. 183-184.

Henegariu, O., Cachiță, C.D., Suciu, T., Pamfil, D., 1981, Înmulțirea "in vitro" a garoafelor prin minibutași. În: *Culturile de țesuturi, instrument de cercetare în biologia vegetală teoretică și practică.* Lucrările Primului Simpozion de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale (ed. Preda, V., Puia, I., Cachiță, C.D.), Cluj-Napoca, p. 373-381.

Hartmann, H.T., Kester, D.E., 1975, *Plant propagation: Principles and practices* (3rd ed.), Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Heller, R., 1953, Rescherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. Ser.*, II, p.1.

Henderson, J.H.M., 1954, The changing nutritional pattern from normal to habituated sunflower callus tissue *in vitro*. Année biol. 30, p. 329.

Hicks, G.S., 1994, Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a development perspective. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 30 P., p. 10-15.

Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., 1949, The influence of various carbon compounds on the growth of marigold, Paris-daisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissue *in vitro*. Amer. J. Bot., 36, p. 75.

Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., 1953, Influence of concentrations of sugars and polysaccharides on callus tissue growth *in vitro*. Amer. J. Bot. 40, p.66.

Holdgate, D.P., 1977, Propagation of ornamentals by tissue culture. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* (ed. Reinert, J. & Bajaj, Y.P.S.), New York: Springer/Verlag, p. 18-43.

Homès, J., Cachiță, C.D., 1976, *Modifications histologiques induites par la procaine sur des* tissus cultivés "in vitro". Actes du 101e Congr. nat. de soc. savantes, Lille, Sci., 1, p. 557-562.

Hopgood, M.E., 1979, The successful propagation *in vitro* of two rootstocks of Prunus: The plum rootstock Pixy (*P. insititia*) and the cherry rootstock F12/1 (*P. avium*). J. Hortic. Sci. 54, p. 63-66.

Horsch, R.B., Fry, J., Hoffman, H., Walroth, M., Eichholtz, D., Rogers, S., Fraley, R., 1985, A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227, p. 1229-1231.

Hussey, G., Stacey, H.J., 1984, Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany*, 53, p. 565-578.

Hüsemann, W., Barz, W., 1977, Photoautotrophic growth and photosyntesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*, Physiol. Plant., 40, p. 77-81.

Jensen, C.O., 1910, Von echten Geschwülsten bei Pflanzen. Deuxième Conférence International pour l'Etude du Cancer. Rapport. Paris. K. Vet. Højsk Aarsskr. 7, p.243.

Jones, O.P., Hatfield, S.G.S., 1976, Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxinus and phenolic compounds. J. Hortic. Sci. 52, p. 495-499.

Jones, O.P., Pontikis, C.A., Hopgood, M.E., 1979, Propagation of five apples scions cultivars. Journal of Horticultural Science,54, p. 155-158.

Jones, L.E., Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., Wu, J.H., 1960, Growth of somatic tobacco cells in microculture. Amer. J. Bot. 47, p. 468.

Julliard, J., Sossountov, L., Habricot, Y., Pelletier, G., 1992, Hormonal requirement and tissue competency for shoot organogenesis in two cultivars of *Brassica napus*. Physiol. Plant. 84, p.521-530.

Kanta, K., Rangaswamy, N.S., Maheswari, P., 1962, Test-tube fertilization in a flowering plant. Nature 194, p. 1214-1217.

Kevers, C., Gaspar, Th., 1985 a, Soluble membrane and wall peroxidases, phenyilalanine ammonia-lyase, and lignin changes in relation with vitrification of carnation tissues cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.* 118, p. 41-48.

Kevers, C., Gaspar, T., 1985 b, Vitrification of carnation *in vitro*: changes in ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. Plant Cell Tissue Organ Culture 4, p. 215-223.

Knop. W., 1865, Quantitative Untersuchungen über den Ernäfrungsprozess der Pflanzen. Landw Versuchs Stat, 7,p. 93-107.

Knop. W., 1884, Bereitung einer concentrierten Nährstofflosung für Pflanzen. Landw. Versuchs-Stat, 30, p. 292-294.

Knudson, L., 1922, Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botan. Gaz. 73, p. 1-25.

Knudson, L., 1925, Pysiological study of the symbiotic germination of orchid seeds. Botan. Gaz. 77, p.345-379.

Kotte, W., 1922 a, Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen. Beitr Allg Bot 2, p. 413.

Kotte, W., 1922 b, Wurzelmeristem in Gewebekultur. Ber. Deutsch. Bot. Gesellsch 40, p. 269-272.

Kozai, T., 1991a, Autotrophic micropropagation. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 17: *High-tech and Micropropagation* I (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag, New York, p. 313-343.

Kozai, T., 1991 b, Micropropagation under photoautotrophic conditions, In: *Micropropagation: Technology and Applications* (ed. Debergh, P., Zimmermann, R.), Kluwer Academic Publs., Dordrecht, Olanda, p. 447-469.

Kozai, T., 1991 c, Controlled environments in conventional and automated micropropagation. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol. 8 (ed. Vasil, I.), Academic Press, New York, p. 213-230.

Kozai, T., Fujiwara, K., Hayashi, M., 1986-1991, *Collected papers on Environmental Control in Micropropagation*. Vol. I (ed. Jeong, B.R.), Chiba Univ., Japan.

Kögl, F., Haagen Smit, A.J., 1931, Über die Chemie des Wuchsstoffs. Proc.K. ned. Acad. Wet.,34, p. 1411-16.

Kögl, F., Kostermans, D.G.F.R., 1935, Über die Konstitutions-Spezifität des Heteroauxin. Hoppe-Seyl. Z., 228, p. 90-103.

Kurosawa, E., 1926, Experimental studies on the secretion of the "bakanae" fungus on rice plants. *Trans.nat. Hist.Soc. Formosa*, 16, p. 213-227.

Kurosawa, E., 1926, Experimental studies on the secretion of *Fusarium heterosporum* on rice plants. *Trans.nat. Hist.Soc. Formosa*, 20, p. 218-239.

Laforge, F., Lussier, C., Desjardins, Y., Gosselin, A., 1991, Effect of intensity and CO_2 enrichment during *in vitro* rooting on subsequent growth of strawberry, raspberry and asparagus in acclimatization. Sci. Hort. 47, p. 259-269.

Larkin, P.J.,Scowcroft, 1981, Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60, p. 197-214.

Letham, D.S., Bollard, E.G., 1961, Stimulant of cell division in developing fruits. *Nature, Lond.* 191, p.1119.

Lazăr, M., Cachiță, C.D., 1981, Înmulțirea crizantemelor "in vitro"prin minibutași. În: *Culturile de țesuturi, instrument de cercetare în biologia vegetală teoretică și practică.* Lucrările Primului Simpozion de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale (ed. Preda, V., Puia, I., Cachiță, C.D.), Cluj-Napoca, p. 383-390.

Lazăr, M., Cachiță, C.D., Bader, S.M., 1981, Micromultiplicarea la crizanteme.I.Înmulțirea "in vitro" a crizantemelor prin explante de peduncul floral. Prod. Veg. Horticultura, 12, p. 18-23.

Limasset, P., Cornuet, P., 1949, Recherche du virus de la Mosaïque du Tabac (*Marmor Tabaci* Holmes) dans les méristémes des plantes infectées. C. R. Ac. Sc., 228, p. 1971-1972.

Lindesey, K., Jones, M., 1989, *Plant Biotechnology in Agriculture*. Open University Press.

Linsmaier, E.M., Skoog, F., 1965, Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 51, p. 685-690.

Loo, S.W., 1945, Cultivation of excised stem tips of *Asparagus in vitro. Amer. J. Bot.* 32, p.13.

Loo, S.W., 1946 a, Further experiments on the culture of excised *Asparagus* stem tips in vitro. *Amer. J. Bot.*, 33, p.156.

Loo, S.W., 1946 b, Cultivation of excised stem tips of dodder *in vitro. Amer. J. Bot.*, 33, p. 295.

Lu, C., Vasil, I.K., Ozias-Akins, P., 1982, Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. Theor. Appl. Genet., 62, p. 109-112.

Maene, L., Debergh, P., 1985, Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongations and rooting. Plant Cell Tissue Org. Cult.5, p. 23-33.

Maene, L., Debergh, P., 1987,Optimalisation of the transfert of tissue cultured shoots to in vivo conditions. Acta Hortic. 212, p. 335-348.

Margara, 1982, *Bases de la multiplication végetative. Les méristèmes et l'organogenèse.* INRA, Paris.

Marin, J.A., Gella, R., Herrero, M., 1988, Stomatal structure and fonctioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. Ann. Bot. 62, p. 663-670.

McCown, D.D., 1986, Plug systems for micropropagules. In: *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops* (ed. Zimmerman, R.H., Griesbach, R.J., Hammerschlag, F.A., Lawson, R.), Martinus Nijhoff, Boston, p. 53-60.

Melchers, G., Sacristan, M.D, Holder, A.A., 1978, Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. Carlsberg. Res. Commun. 43, p. 203.

Milborrow, B.V., 1983, Pathways to and from abscisic acid. In: *Abscisic Acid* (Ed. Addicott, F.T.), Praeger New York, p. 79-111

Milborrow, B.V., 1984, Inhibitors. In: *Advanced Plant Physiology* (ed. Wilkins, M.B.), Pitman, London p. 76-110.

Miles, G.E., Kutz, L.J., 1991, Robots in transplanting. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 17. vol. I: *High-Tech and Micropropagation* (ed. Bajaj, Y.P.S.) Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, p. 452-468.

Miller, C.O., Skoog, F., von **Saltza, M.H., Strong, F.M.,** 1955, Kintein, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J.Am.chem. Soc.*, 77, p. 1392.

Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., Saltza, M.H., Strong, F.M., 1956, Isolation, structure and syntesis of kinetin, a substance promoting cell division. J. Am. Chem. Soc., 78, p. 1375-1380.

Moore, T.C., 1989, *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin, p. 330.

Morel, G., 1946, Action de l'acide pantothénique sur la croissance des tissus d'Aubépine cultivés *in vitro*. *C. R. Ac. Sc.*, 223, p. 166-168.

Morel, G., 1948, Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. Thése, Paris.

Morel, G., 1960, Producing virus-free Cymbidiums. Amer. Orch. Soc. Bull. 29, p. 495-497.

Morel, G., 1963, La culture *in vitro* du méristème de certains orchidées. C.R. Acad, Sci. 256, p. 4955-4957.

Morel, G., 1964, Tissue culture - a new means of clonal propagation of orchids. Amer. Orch. Soc. Bull. 34, p. 473-478.

Morel, G., 1965, Clonal propagation of orchids by meristem culture. Cymbidium Soc. News 20, p. 3.

Morel, G., 1966, La culture *in vitro* du meristeme apical. Rev. Cytol., Paris.

Morel, G., Martin, C., 1952, Guérison de *Dahlias* atteints d'une maladie à virus. C.R. Ac. Sc., 235, p. 1324-1325.

Morel, G., Martin, C., 1955, Guérison des pommes de terre atteintes de maladies à virus. C.R. Acad. Agric. France, 41, p. 472-475.

Muir, W.H., Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., 1954, Plant tissue cultures produced from single isolated cells. Science 119, p. 877-878.

Murashige, T., 1973, Sample preparations of media. In: *Tissue Culture Methods and Applications* (ed. Kruse, P.F. & Patterson, M.K.), New York: Academic Press, p. 698-703.

Murashige, T., 1974, Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol, 25, p. 135-166.

Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Planatrum*, 15, p. 473-497.

Nabors, M.W., Daniels, A., Nadolny, L., Brown, C., 1975, Sodium chloride tolerant lines of tobacco cells. Plant Sci. Lett. 4, p. 155-159.

Nabors, M.W., Gibbs, S.E., Bernstein, C.S., Meis, M.E., 1980, NaCl tolerant tobacco plants from cultured cells. Z. Pflanzenphysiol. 97, p. 13-18.

Nabors, M.W., Kroskey, C.S., McHugh, D.M., 1982, Green spots are predictors of high callus growth rate and shoot formation in normal and in salt-stressed tissue cultures of oat (Avena sativa). Z. Pflanzenphysiol 105., p. 341-350.

Nagata, T., Takebe, I., 1970, Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. Planta 92: p. 301-308.

Nagata, T., Takebe, I., 1971, Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta 99, p. 12-20.

Navarro, L., Roistscher, C.N., Murashige, T., 1975, Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free *Citrus*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 100, p. 471-479.

Negruțiu, I., Jacobs, M., Cachiță, C.D., 1978, Some factors controlling "*in vitro*" morphogenesis of *Arabidopsis thaliana*. Z. Pflanzenphysiologie, 86, 2, p. 113-124.

Neljubow, D., 1901, Über die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer Pflanzen. *Beith. bot. Zbl.*, 10, p. 128-138.

Nétien, G., Beauchesne, G., 1953, Essai d'isolement d'un factor de croissance présent dans un extrait laiteux de caryopses de *Mais immatures*. Année Biol. 30, p.437.

Nickell, L.G., Greenfield, R.J., Burkholder, P.R., 1950, Atypical growth of plants. III. Growth responses of virus tumors of *Rumex* to certain nucleic acid components and related compounds. Bot. Gaz., 112, p. 42-52.

Nitsch, J.P., 1972, Haploid plants from pollen, Z. *Pflanzenzuecht.*, 67, p.3.

Nitsch, J.P., Nitsch, C., 1956, Auxin-dependent growth of excised *Heliantus tuberosus* tissues. Amer. J. of Bot., 43, p. 839-851.

Nitzsche, W., 1983, Germplasm preservation. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1 (ed. Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., Yamada, Y.), Macmillan, New York, p. 782-805.

Nobécourt, P., 1939, Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissues végétaux. C.R. Soc. Biol. 130, p. 1270-1271.

Pătraşcu, M., 1983, *Noutăţi în manipularea informaţiei genetice*. Şt. şi Tehn. ptr. Toţi, Ser. Agricultură, Bucureşti.

Petrescu, C., Cachiţă, C.D., 1993, *Curs de Biotehnologie. Culturi de ţesuturi in vitro cu aplicaţii în horticultură*. Ed. Academia Universitară "Athenaeum", Bucureşti.

Pierik, R.L.M., 1971, Plant tissue culture as motivation for the symposium. In: *Effects of sterilization on components in nutrient media* (ed. van Bragt, J., Mosel, D.A.A., Pierik, R.L.M., Veldstra, H.), Wageningen: Veenman, H., Zonnen, N.V., p. 3-13.

Pierik, R.L.M., 1984, *In vitro Culture of Higher Plants*. Ed. Internat. Agr. Centre, Wageningen.

Pierik, R.L.M., 1987, Laboratory equipment. In: *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Hijhoff, Dordrecht, p. 31-42.

Pierik, R.L.M., 1991, Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. In: *Micropropagation of Horticultural Crops* (ed. Debergh, P.C., Zimmerman, R.H.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Glanda p. 157-165.

Pierik, R.L.M., 1998, *In vitro culture of higher plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

Pieron, S., 1995, Etudes physiologique des nodules observés sur feuilles de chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* L. cv. "Witloof") cultivées *in vitro*. Thèse, Fac. Sci. Agron. Gembloux (Belgique).

Potrykus, I., Shillito, R.D., Saul, M., Paszkowski, J., 1985, Direct gene transfer: State of the art and future potential. Plant Molecular Biology Report, 3, p. 117-128.

Power, J.B., Cummins, S.E., Cocking, E.C., 1970, Fusion of isolated plant protoplasts. Nature 225, p. 1016-1018.

Preda, V., Puia, I., Cachiţă, C.D., (ed.), 1981, *Culturile de ţesuturi-instrument de cercetare în biologia vegetală teoretică şi practică. Lucrările primului Simpozion Naţional de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale*, Cluj-Napoca. Tipo Agronomia Cluj-Napoca.

Quoirin, M., Lepoivre, P., 1977, Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Acta Hortic., 78, p. 437.

Quoirin, M., Boxus, P., Gaspar, T., 1974, Root initiation and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature *Prunus* plants. *Physiol. Veg.*, 12, p. 165.

Quaqk, F., 1961, Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus-free plants. In: *Advances in Horticultural Science and their*

Application, Proceedinds of the 15th International Horticulture Congress 1958, I, p. 144-148.

Quack, F., 1977, Meristem culture and virus-free plants. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (ed.: Reinert, J., Bajaj, Y.P.S.), Springer Verlag Berlin, heildelberg, New York, p. 598-616.

Raicu, P., Badea, E.M., 1984, Manipulări genetice de celule la nivelul protoplaştilor. În: *Culturi de celule şi ţesuturi vegetale – aplicaţii în agricultură*, Ed. Ceres, Bucureşti, cap. V. p. 225-236.

Raicu, P., Badea, E.M., 1986, *Cultura de celule şi biotehnologiile moderne*, Ed. Ştiinţ. şi Enciclo. Col. "Ştiinţa pentru toţi", Bucureşti.

Raicu, P., Dumitru, I., Boldor, O., Atanasiu, L., Popa, L., Meşter, R., Iordăchescu, D., Popovici, Gh., Badea, E., Flonta, M.L., Ardelean, I., 1970, *Biotehnolgii moderne*, Ed. Tehnică, Bucureşti.

Rakosy, T.L., 1998a, *Utilizarea tehnicilor de electrofuziune în hibridarea somatică a plantelor.*, Presa Univ. Clujană.

Rakosy, T.L., 1998b, *Plant Genetic Engineering. Lab Manual.*, Presa Univ. Clujană.

Rakosy-Tican, L., Neamţu, S., Turcu, I., Lucaciu, M.C., 2000, Electroporarea şi electrostimularea, tehnici cu implicaţii în biotehnologia vegetală. În: *Actualităţi şi Perspective în Biotehnologia vegetală.*, 1999, Constanţa (ed. Cachiţă, C.D., Bavaru, A., Brezeanu, A.), Ovidius Univ. Press., p. 64-79.

Rapparini, F., Baraldi, R., Bertazza, G., Brazanti, B., Predieri, S., 1994, Vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation of micropropagated fruit trees. J. Hortic. Sci. 69. p. 1101 1109.

Reinert, J., 1956, Dissociation of cultures of *Picea glauca* into small tissue fragments and single cells. Science 123, p. 457.

Reinert, J., 1958, Morphogenese und ihre Kontrole au Gewebekulturen aus Karotten. Naturwissenschaften, 45, p. 344-345.

Reinert, J., 1959, Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventioembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta* 53, p. 318-333.

Reinert, J., Bajaj, Y.P.S., 1977, Anther culture, haploid production and its significance. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* (ed. Reinert, J. & Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag New York, p. 251-264.

Reinert, J., Yeoman M.M., 1982, *Plant Cell and Tissue Culture. A Laboratory Manual.* Spinger-Verlag, Berlin.

Reinert, J., Backs, D., Krösing, M., 1966, Faktoren dem Embryogenese aus Umbelliferen. *Planta.* 68, p.375-378.

Reinert, J., Backs-Husemann, D., Zerban, H., 1971, Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota.* În: *Les Cultures de Tissus de Plantes.* Colloques internationaux du C.N.R.S., Paris, 193, p. 261-268.

Riker, A.J., Hildebrandt, A.C., 1954, Pathological plant growth. Ann. Rev. Microtissue in culture. Ann. Biol., 30, p. 283-296.

Riker, A.J., Hildebrandt, A.C., 1958, Plant tissue cultures open a botanical frontier. *Annu. Rev. Microbiol.* 12, p. 469.

Robins, W.J., 1922, Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. Bot. Gaz.,73, p. 376-390.

Robbins, W.J., Bartley Schmidt, M.B., 1938, Growth of excised roots of the tomato. *Bot. Gaz., 99*, p. 671-728.

Ross, M.K., Thorpe, T.A., Costerton, J.W., 1973, Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. Am. J. Bot. 60 (8), p. 788-795.

Roşu, A., 1999, *Elemente de biotehnologii vegetale, aplicații în ameliorare*, Ed. Ametist, 92, București.

Rowe, W.J., 1986, New technologies in plant tissue culture. In: *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Plants* (ed. Zimmerman, R.H, Griesbach, R.J., Hammerschlag, F.A., Lawson, R.H.). Pub. Martinus Nijhoff.

Schleiden, M.J., 1838, Beiträge zur Phytogenesis. *Arch. Anat., Physiol. u. Wiss. Med.* (J. Műler), p. 137-176.

Schwann, T., 1839, *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstume der Tiere und Pflanzen*. Leipzig, W. Engelmann, nr. 176. Ostwalds Klassiker der exakten Wissenschaften, p. 1910.

Seilbert, M., 1976, Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to –196°C. Science 191, p. 1178-1179.

Skoog, F., 1944, Growth and organ formation in tobacco tissue culture. Amer. J. Bot. 31, p. 19.

Skoog, F., Miller, C.O., 1957, Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11, p. 118-131.

Skoog, F., Tsui, C., 1951, Growth substances and the formation of buds in plant tissues. În: *Plant Growth Substances* (ed. Skoog, F.), Wisconsin University Press, p. 263-285.

Skoog, F., Hamzi, H.O., Szweykowska, A.M., Leonard, M.J., Carraway, K.L., Fujii, T., Helgeson, J.P., Loeppky, R.N., 1967, Cytokinins: Structure/activity relationships. Phytochemistry, 6, p. 1169-1192.

Slabecka-Szweykowska, A., 1955, On the influence of the wave length of light on the biogenesis of anthocyanin pigment in the *Vitis vinifera* tissue *in vitro*. *Act. Soc. Bot. Pol., 24*, p.3-11.

Smith, H.H., 1974, Model systems for somatic cell plant genetics. BioScience, 24, p.269

Soran, V., Rakosy-Tican, L., Ardelean, A., 1993, *Elemente de Biotehnologie*. Ed. Mirton, Arad.

Söding, H., 1937, Über Wuchsstoffteste. *Jb. wiss. Bot.*, 85, p. 770-787.

Steward, F.C. Caplin, S.M., 1952, Investigation on growth and metabolism of plant cells. IV. Evidence on the role of the coconut milk factor in development. Ann. Bot., Lond. 16, p. 491.

Steward, F.C., Shanz, E.M., 1955, The chemical induction of growth in plant tissue cultures. In: *The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances* (ed. Wain, R.L., Wightman, F.), Butterworth, London, p. 165-186.

Steward, F.C., Mapes, M.O., Mears, K., 1958 a, Growth and organised development of cultured cells. II. Organisation in cultures grown from freely suspended cells. Amer. J. Bot. 45, p. 705-708.

Steward, F.C., Mapes, M.O., Smith, J., 1958 b, Growth and organised development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. Amer. J. Bot. 45, p. 693.

Steward, F.C., Mapes, M.O., Kent, A.E., Holstein, R.D., 1964, Growth and development of cultured plant cells. Science, 143, p. 20-27.

Street, H.E., 1966 a, The nutrition and metabolism of plant tissue and organ cultures., în: *Cells and Tissues in Culture. Methods, Biology and Physiology* (ed. Willmer E.N.), Acad. Press, London New-York, vol. 3 Cap. 9, p. 533-629.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Street, H.E., 1966 b, Growth, differentiation and organogenesis in plant tissue and organ cultures. In: *Cells and Tissues in Culture. Methods, Biology and Physiology* (ed. Willmer E.N.), Acad. Press, London New-York, vol. 3 Cap. 10, p. 631-689.

Street, H.E., 1973, *Plant Tissue and Cell Culture. Botanical Monographs.* Vol. 11. University of California Press. Berkeley, Los Angeles.

Street, H.E., 1977 a, *Plant Tissue and Cell Culture. Botanical Monographs.* 2nd ed. Vol. 11. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Melbourne

Street, H.E., 1977 b, Cell suspension cultures tehniques. In: *Plant Tissue and Cell Culture* (ed. Street H.E.), 2nd ed. Blackwell, Oxford, p. 61.

Street, H.E., 1977 c, Introduction. In: *Plant Tissue and Cell Culture* (ed. Street, H.E.) Oxford, UK: Blackwell, p. 1-10.

Street, H.E., Henshaw G.G., 1966, Introduction and methods employed în plant tissue culture. In: *Cells and Tissues in Culture. Methods, Biology and Physiology* (ed. Willmer E.N.), Acad. Press, London New-York, vol. 3 Cap. 8, p. 459-532.

Street, H.E., Butcher, D.N., Handoll, C., Winter, A., 1964, "Règulateurs naturels de la croissance végétale". *Proceeds 5th International Conferences Natural Plant Growth Regulators*, C.N.R.S., Paris, p. 529-541.

Sunderland, N., 1974, Anther culture as a means of haploid induction. In: *Haploids in Higher Plants. Advances and potential* (ed. Kasa, K.J.). Guelph, Ontario, Canada. Univ. of Guelph Press, p. 91-122.

Taiz, L., Zeiger, E., 1991, *Plant Physiology.* The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., SUA.

Takebe, I., Labib, G., Melchers, G., 1971, Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften 58, p. 318-320.

Takebe, I., Otsuki, Y., Aoki, S., 1968, Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant Cell Physiol 9, p. 115-124.

Thimann, K.V., 1977, *Hormone action in the whole life of plants.* Univ. of Massachusetts Press, Amherst.

Thomas, M., David, A., Bigot, C., 1983, L'arbre *in vitro*. Bull. Soc. Bot. Fr. 130 Actual. Bot. 2, 112.

Thorpe, T.A., (ed), 1978, *Frontiers of Plant Tissue Culture. Proceedings of the 4th International Congress Plant Tissue and Cell Culture.* Univ. of Calgary, Calgary, Canada.

Thorpe, T.A., (ed), 1981, *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture.* Academic Press New York, London, Toronto, Sydney.

Tisserat, B.H., Murashige, T., 1977, Probable identity of substances in citrus that repress asexual embryogenesis. *In vitro,* 13, p. 785.

Torrey, J.G., 1957, Auxin control of vascular pattern formation in regenerating pea root meristem grown *in vitro*. Amer. J. Bot. 44, p. 859.

Torrey, J.G., 1959, Experimental modification of development in the root. In: *Cell, Organism and Milieu* (ed. Rudnick, D.), Ronald Press, New York, p. 189-222.

Toussaint, A., 1985, Contribution à la caractérisation des viroses de *Cymbidium* cvs cultivés en Belgique et posibilité de leur éradication par la culture *in vitro*. Thése Fac. Sci. Agron., Gembloux (Belgique).

Toussaint, A., Kummert, J., Maroquin, c., Lebrun, A., Roggemans, J., 1993, Use of Virazole® to eradicate *Odontoglossum* ringspot virus from *in vitro* cultures of *Cymbidium* SW. Plant Cell Tissue Org. Cult. 32, p. 303-309.

Towill, L.E., 1981, Survial of at low temperatures of shoot-tips from cultivars of *Solanum tuberosum* group Tuberosum. Cryo Lett 2, p. 373-382.

Ungureanu, A., 1990, *Înmulțirea plantelor prin culturi de țesuturi*, Ed. Ceres, București.

Van Overbeek, J., Conklin, M.E., Blakeslee, A.F., 1941, Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. Science, 94, p. 350-351.

Vanderschaeghe, A.M., Debergh, P.C., 1987, Technical aspects of the control of the relative humidity in tissue culture containers. In: *Plant Micropropagation in Horticultural Industries. Preparation, Hardening and Acclimatization Process* (ed. Ducaté, Jacob, Siméon, Arlon), Belgium, BPTC group, Florizel, p. 68-76.

Vasil, I., Thorpe, T.A., 1994, *Plant Cell and Tissue Culture*, Ed. Kluwer Academic.

Vasil, V., Vasil, I.K., 1981 a, Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Ann. Bot.* 47, p. 669-678.

Vasil, V., Vasil, I.K., 1981 b, Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum*, and *P. americanum x P. purpureum* hybrid. *Amer. J. Bot.* 68 (6), p. 864-872.

Viseur, J., 1987, Micropropagation of pear, *Pyrus communis* L., in a double phase culture medium. Acta Hortic. 212, p. 117-124.

Vőchting, H., 1878, *Über Organbilding im Pflanzenreich*. vol. 1. Verlag von Max Cohen und Sohn, Bonn.

Vőchting, H., 1892, *Über Transplantation am Pflanzenkörper*. Tubingen: Verlag H. Laupp'schen Buchhandlung.

Vőchting, H., 1904, Über die Regeneration der *Araucaria excelsa*. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* 40, p. 144-155.

Wang, P.J., Charles, A., 1991, Micropropagation through meristem culture. In: "*Biotechnology in Ariculture and Forestry*. Vol. 17. *High-Tech and Micropropagation*" I (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer-Verlag, Berlin, p. 32-52.

Wang, P.J., Hu, C.Y., 1980, Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. In: "*Advances in Biochemical Engineering* vol. 18, *Plant Cell Cultures* II" (ed. Fiechter, A.), Springer-Verlag, Berlin, p. 61-99.

Wang, P.J., Huang, L.C., 1976, Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ culture. *In Vitro*, 12, p. 260-262.

Went, F., 1928, Wuchsstoff und Wachstum. Recl. Trav.bot néerl., 25, p. 1-116.

Went, F., Thimann, K.V., 1937, *Phytohormones*. Macmillan, London.

Wetmore, R.H., Rier, J.P., 1963, Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. *Amer. J. Bot.* 47, p. 418.

Wetzstein, H.Y., Sommer, H.E., 1982, Leaf anatomy of tissue-cutured *Liquidambar styraciflua* (*Hamamelidaceae*) during acclimatization, Amer J. Bot. 69, p. 1579-1586.

White, Ph.R., 1932 a, Influence of some environmental conditions on the growth of excised root tips of wheat seedings in liquid media. *Plant Physiol., 4*, p. 613-628.

White, Ph.R., 1932 b, Plant tisuue cultures. A preliminary report of results obtained in the culturing of certain plant meristems. *Arch. f. exp. Zellf.*, 12, p. 602-628.

White, Ph.R., 1933 a, Liquid media as substrata for the culturing of isolated root tips. Biol. Zentralbl., 53, p. 359-364.

White, Ph.R., 1933 b, Concentrations of inorganic ions as related to growth of excised root-tips of wheat seedings. *Plant Physiol., 8*, p. 489-508.

White, Ph.R., 1934 a, Multiplication of the viruses of tobacco and aucuba mosaics in growing excised tomato root tips. Phytopatology 24, p. 1003-1011.

White, Ph.R., 1934 b, Potentially unilimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol., 9, p. 585-600.

White, Ph.R., 1939a, Potentially unilimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. Amer. J. Bot., 26, p. 59-64.

White, Ph.R., 1939b, Controlled differentiation in a plant tissue culture. Bull. Torrey bot. Club 66, p. 507.

White, Ph.R., 1943, *A Handbook of Plant Tissue Culture.* Lancaster, P.A. Jaques Cattel Press.

White, Ph.R., 1945, Metastatic (graft) tumors of bacteria-free crown-gall on *Vinca rosea.* Amer. Jour. Bot., 32, p.237-241.

White, Ph.R., 1963, *The Cultivation of Animal and Plant Cells,* 2nd edn. Ronald Press, New York.

Withers, L.A., Alderson, P.G., 1986, *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications.* Pub. Butterworths.

Yamada, Y., Sato, F., 1978, The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. Plant and Cell Physiol, 19, p. 691-699.

Yamada, Y., Sato, F., Hagimori, M., 1978, Photoautotrophism in green cultured cells. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture. Proceedings the 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture.* Univ. of Calgary, Canada. (ed. Thorpe, T.A.), International Association of Plant Tissue Culture, p. 453-462.

Yamada, T., Shoji, T., Sinoto, Y., 1963, Formation of calli and free cells in the tissue culture of *Tradescantia reflexa.* Bot. Mag. Tokyo 76, p. 332-339.

Yamada, T., Shoji, T., Sinoto, Y., 1964, Cytological studies on cultured cells. II. Formation of calli and general behaviour of their cells in the tissue cultured of *Tradescantia paludosa.* Bot. Mag. Tokyo, 77 p. 436-446.

Zenk, M.H., 1978, The impact of plant cell culture on industry. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture. Proceedings the 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture.* (ed. Thorpe, T.A.),. Univ. of Calgary: International Association of Plant Tissue Culture, p. 1-13.

Zimmerman, R., 1982, Genetic stability of horticultural plants propagated by tissue culture. *Intl. Plant. Prop. Soc. Combined Proc.* 31, p. 118-126.

Zimmerman, R.H., Swarz, H.J., 1994, *In vitro* culture of temperate fruits. In *Plant cell tissue culture* (Ed. Vasil I.K. & Thorpe, T.A.), Dordrecht, Olanda: Kluwer, p. 457-474.

Zimmerman, R.H., Griesbach, R.J., Hammerschlang, F.A., Lawson, R.H., 1986, *Tissue culture as a Plant Production System for Horticultural Crops.* Pub. Martinus Nijhoff.

Ziv, M., 1990, Morphogenesis of *Gladiolus* buds in bioreactors. Implication for scaled-up propagation of geophytes. In: "*Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*". *Proceedings of the VII th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture,* Amsterdam (ed. Nijkamp H.J.J., Van der Plas, L.H.W., Van Aartrijk, J.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Olanda. p. 119-124

Ziv, M., 1991, Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: "*Micropropagation*" (ed. Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Olanda, p. 45-69.

Zryd, J.P.,1988, *Cultures de Cellules, Tissus et oranges végétaux.* Pub. Presses Polytechniques Romandes.

5. CULTURILE DE CELULE LA CORMOFITE

5.1. INTRODUCERE

Motivele inițiale care au stat la baza cercetărilor cu privire la culturile de țesuturi și celule vegetale au fost, în special, din considerente științifice. În acest context, s-a presupus că astfel de culturi (mai ales cele de celule) prezintă mai multe avantaje, în cadrul studiilor de biosinteză și de fiziologie, față de utilizarea plantelelor intacte. Astfel, culturile celulare (sau suspensiile celulare) vegetale au un minim de organizare și sunt sisteme nediferențiate în care încorporarea anumitor compuși și urmărirea lor ulterioară poate fi ușor monitorizată. În plus, acestea oferă o cale unică în extinderea studiilor din domeniul *patologiei plantelor*, pentru lămurirea cauzelor care conduc la formarea tumorilor și la interacțiunea gazdă-parazit.

O altă posibilitate de aplicare a tehnicii culturilor de țesuturi vegetale, și în special a celor de suspensii celulare, este aceea de a obține *compuși naturali* (sau *metaboliți secundari*) valoroși, produși care pot fi utilizați în industria farmaceutică și în agricultură. Culturile de celule pot fi manipulate de o asemenea manieră încât acești compuși să poată fi extrași atât din celule, cât și din mediul în care ele au fost cultivate. Cercetările efectuate cu suspensii celulare induse din plante medicinale au dovedit că ele sunt capabile, în anumite cazuri, să sintetizeze și să acumuleze principii farmacologic active, în cantități care, uneori, le depășesc pe cele identificate în plantele intacte. De asemenea, culturile de țesuturi și celule vegetale pot fi utilizate pentru conservarea plasmei germinale (germoplasmei) și în studiul clonării de gene, în scopul obținerii *plantelor transgenice*.

Tot în acest context, trebuie menționată și capacitatea culturilor celulare vegetale de a *biotransforma* specific, prin intermediul sistemului lor enzimatic, anumite substrate (naturale sau sintetice), mai rentabile din punct de vedere economic, în altele mult mai valoroase. De asemenea, pe baza principiului totipotenței, care stipulează faptul că orice tip de celulă somatică poate da naștere – în anumite condiții – la o plantă normal dezvoltată, culturile de celule vegetale pot fi utilizate pentru propagarea economică a plantelor, prin intermediul *embrionilor somatici*, via *semințe artificiale*.

În ultimii ani, numărul oamenilor de știință care utilizează tehnica culturilor de țesuturi și celule vegetale în cercetările de morfologie, anato-

mie, fiziologie, genetică şi biologie moleculară vegetală, a crescut rapid. Aceasta se datorează, în parte, progreselor înregistrate în acest domeniu, progrese care au făcut posibilă sporirea seriei de experimente reproductibile în care sunt implicate ţesuturile şi celulele vegetale cultivate *in vitro*. De asemenea, s-a mărit considerabil şi numărul de lucrări publicate în care sunt descrise aspecte care privesc tehnicile culturilor de ţesuturi şi celule vegetale, aşa cum sunt: procedee de manipulare, metode de sterilizare, compoziţia mediilor de cultură, condiţii de incubare a inoculilor, metode de multiplicare etc. Totuşi, dintre publicaţiile existente, rămân şi astăzi în vigoare – ca şi tratate de bază – cele editate de *Gautheret* (1959; 1977) şi *Street* (1977). La noi în ţară, *Cachiţă* (1984;1987) a fost unul dintre primii cercetători care au abordat acest domeniu.

5.2. CULTURILE DE CELULE VEGETALE SCURT ISTORIC

Pentru a aprecia realizările obţinute în domeniul tehnologiei culturilor de ţesuturi şi celule vegetale este necesară prezentarea unui scurt istoric. Analizând majoritatea studiilor efectuate în direcţia sintetizării principalelor etape pe care le-a parcurs în evoluţia sa domeniul culturilor de ţesuturi şi celule vegetale, se observă că este aproape imposibilă decelarea drumului urmat de culturile de ţesuturi de cel al suspensiilor celulare, deoarece, toate descoperirile din aceste subdomenii sunt strâns corelate. În acest sens, considerăm că *Gautheret* (1985) a realizat, până în prezent, una dintre cele mai valoroase treceri în revistă a principalelor aspecte teoretice şi tehnice ale dezvoltării domeniului culturilor de ţesuturi şi celule vegetale, precum şi a celor biotehnologice.

În general, succesul cercetărilor experimentale depinde de doi factori importanţi. Unul dintre aceştia constă în apariţia unor descoperiri neaşteptate, iar celălalt este datorat progresului tehnic. După *Gautheret* (1985), istoricul, de fapt *preistoricul* culturilor de ţesuturi şi celule vegetale, a început încă în urmă cu cca 240 de ani, prin descoperirea formării calusului la plante, de către *Duhamel*, "Seigneur du Monceau et de Vrigny", care identifica – în anul 1756 – în calus materialul vegetal care va fi utilizat, după 178 de ani, în primele încercări de iniţiere a culturilor celulare, vegetale.

Istoricul culturilor de ţesuturi şi celule vegetale poate fi caracterizat printr-o multitudine de etape ce privesc metodologia de lucru, etape care au fost marcate, în acest domeniu, de apariţia unui număr însemnat de noi tehnici, caracterizate ca "tehnici de ruptură sau de breşă". În primii ani, multe dintre acestea, aşa cum sunt: cultura continuă de rădăcini, culturile de calus

dintre acestea, aşa cum sunt: cultura continuă de rădăcini, culturile de calus şi de celule, cultura de antere, cultura de protoplaşti, precum şi producţia de hibrizi somatici, au constituit preambulul exploziei unei ample activităţi de cercetare cu caracter fundamental. Majoritatea cercetătorilor implicaţi în aceste studii au urmărit şi posibilitatea aplicării unor astfel de cercetări. Deşi prin prisma rezultatelor obţinute se întrevedea o gamă largă de aplicare a culturilor vegetale *in vitro*, totuşi numai câteva dintre tehnicile respective s-au dovedit a fi apte de a se transpuse în practică, la nivel industrial. Una dintre acestea a fost şi obţinerea de *principii biologic active*. În anii care au urmat, s-au pus la punct o serie de alte tehnici care s-au dovedit, în final, a fi şi ele tot "tehnici de breşă". Dintre ele pot fi citate integrarea în genomul celulelor vegetale a unor gene străine şi exprimarea lor în plantele regenerate, precum şi îmbunătăţirea procedurilor privind culturile de ţesuturi şi celule induse din plante valoroase din punct de vedere economic, aşa cum sunt cerealele. De asemenea, s-a produs o revigorare a cercetărilor biotehnologice datorită faptului că vechile companii multinaţionale biotehnologice, ca şi cele noi, de altfel, au luat în calcul şi aplicarea, respectiv valorificarea cercetărilor de biologie celulară şi moleculară.

Referindu-ne strict la domeniul culturilor de celule vegetale, trebuie să subliniem faptul că istoricul lor este strâns legat de aspectul practic, aplicativ. În acest context, aşa cum am mai arătat, culturile celulare au fost şi sunt utilizate fie pentru micropropagare, via embrioni somatici, fie pentru obţinerea compuşilor secundari. Deoarece studiul privind embriogeneza somatică şi producerea metaboliţilor secundari prin intermediul suspensiilor celulare vegetale va fi publicat în alte lucrări, în acest capitol vom sublinia doar câteva aspecte.

Cercetările mai intense asupra sintezei compuşilor secundari vegetali de către culturile de calusuri şi de suspensii celulare au început din anii '50. Posibilitatea cultivării pe scară largă a celulelor de tutun şi apoi a altor specii de cormofite, a fost examinată între anii 1950–1980 de către: *Tulecke* şi *Nickell* (1959), *Street* şi colaboratorii săi (1973), precum şi de către *Martin* şi colaboratorii săi (1980a). Rezultatele obţinute de ei au stimulat stu-diile ulterioare efectuate asupra aplicării industriale ale culturilor celulare vegetale. Astfel, în ţări ca Japonia, Germania, SUA, Canada etc., s-a dezvoltat puternic tehnologia de fermentaţie, multe companii industriale, în colaborare cu anumite grupuri din universităţi, fiind alese în scopul aplicării acestor tehnologii pentru producţia de compuşi biologic activi.

În ceea ce priveşte capacitatea fermentatoarelor utilizate pentru creşterea culturilor celulare vegetale, trebuie să amintim că după ce *Tulecke*

obținute din mai multe specii de cormofite într-un fermentator de 20 litri, în anii următori, volumul de lucru al bioreactoarelor s-a mărit de mai multe ori, ajungând până la 75.000 litri (*Ritterhaus*, 1990).

5.3. INTRODUCERE ÎN TEHNICA ŞI TEHNOLOGIA CULTURILOR DE ŢESUTURI ŞI CELULE VEGETALE

5.3.1. Terminologia utilizată în domeniul culturilor de ţesuturi şi celule vegetale

Înainte de o prezentare a avantajelor sistemelor de cultivare *in vitro* a celulelor vegetale, considerăm că este necesară o scurtă introducere referitoare la anumite aspecte, aspecte care privesc terminologia şi metodologia folosită în domeniul culturilor de ţesuturi şi celule vegetale. Deoarece, foarte mulţi termeni care privesc culturile de ţesuturi şi celule vegetale, au fost utilizaţi şi descrişi pe larg în alte publicaţii (*Cachiţă*, 1984 şi 1987; *Cachiţă* şi *Sand*, 2000), în acest capitol vom insista asupra acelor termeni care sunt specifici, în deosebi pentru culturile de *calus* şi a celor *de celule*(sau „de *suspensii celulare*).

Cultura primară: termenul este utilizat pentru desemnarea culturii iniţiale, cultură din care vor lua naştere toate celelalte tipuri de culturi *secundare*, succesive, derivate din aceasta, fie ele culturi de ţesuturi sau de celule; culturile derivate fiind denumite *linii*, *clone* sau *suşe*. Astfel, culturile de ţesuturi şi de celule vegetale sunt menţinute totipotente prin operarea periodică de *subcultivări* succesive, efectuate la anumite intervale de timp, subcultivări care au loc prin transferul unor fragmente de ţesuturi sau a unui anumit volum din cultura celulară anterioară (prelevat dintr-o cultură primară, secundară, terţiară ş.a.m.d.), pe un mediu nutritiv proaspăt. (*Street*, 1973 şi 1977; *Gautheret*, 1977; *Dixon*, 1985)

Calusul este o masă de celule neorganizată, proliferativă. Pentru iniţierea culturii de calus, va fi necesară întotdeauna prelevarea de explante din plante sau plantule. Aceste explante vor fi apoi inoculate – în mod aseptic – pe un mediu nutritiv sintetic complex, semisolid, suplimentat cu hormoni vegetali (în special auxine, sau combinaţii de tipul: auxine + citochinine). În continuare, dacă mediul nutritiv utilizat iniţierea culturii se va dovedi a fi optim pentru proliferare, celulele aflate la extremităţile explantului vor da naştere unui calus. O dată generat, calusul va putea fi detaşat de explant şi apoi transferat pe un acelaşi tip de mediu, pentru a fi menţinut *in vitro* prin efectuarea de subcultivări, operate succesiv, sau prin diverse tehnici de stocare. Alternativ, calusul poate fi manipulat în scopul inducerii

tehnici de stocare. Alternativ, calusul poate fi manipulat în scopul inducerii diferențierii celulelor constituiente, diferențiere – care în final – va conduce la regenerarea de plante. De asemenea, calusul poate fi introdus într-un mediu de cultură, de compoziție similară, dar lichid, agitat, în care celulele lui se dispersează formând o cultură de suspensii celulare.

Cultura de celule vegetale, sau *suspensiile celulare vegetale,* sunt termeni sinonimi. Uneori, în publicațiile editate în limba engleză, se mai poate întâlni și un alt termen, și anume cel de *culturi de suspensii celulare vegetale* (Engl. = *plant cell suspension cultures*) – termen care definește același aspect. Totuși, noi considerăm că, în limba română, cei mai adecvați termeni pentru desemnarea cultivării *in vitro* a celulelor cormofitelor sunt cei amintiți mai sus, și anume, cel de cultură celulară vegetală și cel de suspensie celulară vegetală.

O astfel de cultură de celule este formată dintr-un amestec de celule solitare (care cresc și se divid independent) și de agregate celulare, amestec care se află suspendat într-un anumit volum de mediu nutritiv lichid, mediu care trebuie agitat continuu. Agitarea mediului este necesară pentru ca toate celulele aflate în suspensie să se afle, în permanență, în contact cu nutrienții din mediu și cu oxigenul dizolvat în acesta. Pentru realizarea unei astfel de mixări se pot utiliza o serie de instalații și aparate. În cazul în care se folosec agitatoare orizontale, rotative, suspensiile celulare sunt cultivate în vase *Erlenmeyer*, de diferite mărimi.

Pentru menținerea suspensiilor celulare este necesară subcultivarea lor, periodică, în medii proaspete. Termenii de *transfer*, *pasare*, *transplantare* sau *subcultivare* definesc același procedeu tehnic și anume, trecerea unei anumite cantități de celule (inocul), cu sau fără diluție, dintr-o cultură de suspensii aflată într-un anumit stadiu de desfășurare a ciclului ei celular (cel mai adesea sfârșitul fazei lineare de creștere), într-un mediu nutritiv, proaspăt. Celulele aflate în suspensie sunt, teoretic, totipotente și pot sintetiza orice compus pe care îl produce planta intactă, sau pot să dea naștere – în anumite condiții – la embrionii somatici. În cazul culturilor de țesuturi calusale, dar mai ales a celor de suspensii celulare, se întâlnesc o serie de termeni care trebuie explicați. Aceștia sunt:

- *linia celulară* - rezultă dintr-o cultură primară, în cursul primei subcultivări reușite. Termenul de linie celulară implică acele culturi care sunt alcătuite din numeroase sublinii de celule originare, prezente în cultura primară. În publicațiile în care se descrie cultura, trebuie să apară și caracterizarea acesteia, sau "istoricul" ei. Dacă ea a fost obținută de la alte laboratoare, trebuie desemnat

descrierea culturii. Termenii de cultură *limitată*, sau de cultură *continuă*, trebuie specificați, dacă starea culturii este cunoscută;

- *suşa celulară* derivă fie dintr-o cultură primară, fie dintr-o linie celulară – prin slecție sau clonare – şi are proprietăți specifice care trebuie să persiste în decursul următoarelor subcultivări. În descrierea suşei celulare particularitățile ei trebuie să fie definite. Dacă aceasta a fost obținută de la alte laboratoare, trebuie desemnat proprietarul culturii, cu specificarea numelui originar, adresa şi descrierea culturii. De asemenea, termenii de *limitată* sau *continuă* trebuie specificați dacă starea culturii este cunoscută;
- *clona celulară* este o populație de celule derivată dintr-o singură celulă, în urma mitozei. O clonă nu este necesar să fie omogenă şi, de aceea, termenul de clonă sau de clonare nu este obligatoriu să fie utilizat pentru a indica omogenitatea populațiilor de celule.

5.4. TEHNICA CULTURILOR DE CALUS ŞI A SUSPENSIILOR CELULARE VEGETALE

5.4.1. Importanța asepsiei

Unul dintre cele mai importante criterii care trebuie respectate cu strictețe, mai ales în cazul culturilor de celule vegetale, este menținerea sterilității lor. Mediile nutritive în care cresc culturile vegetale *in vitro* sunt alcătuite dintr-o multitudine de compuşi minerali şi organici. În astfel de medii – cu excepția culturilor *fotoautotrofe* – se utilizează concentrații mari de hidrați de carbon (2 – 5% zaharoză). În consecință, într-un astfel de mediu, în special în cel lichid, se pot dezvolta foarte bine şi exploziv, microorganisme mai mult sau mai puțin patogene. Având în vedere că astfel de microorganisme au o rată de multiplicare şi de creştere superioară celulelor cormofitelor, acestea vor altera compoziția şi calitățile mediului de cultură. Astfel, metaboliții produşi de către celulele microbiene pot afecta direct metabolismul celulelor vegetale (adesea prin mărirea metabolismului secundar) şi pot, în acest mod, să modifice ireversibil caracteristicile liniilor celulare.

5.4.2. Testarea asepsiei culturilor celulare

Deoarece în mai multe publicații apărute la noi în țară (*Cachiță*, 1984 şi 1987; *Cachiță* şi *Sand*, 2000) au fost descrise, pe larg, tehnicile de sterilizare ale instrumentarului, sticlăriei şi materialului vegetal (tehnici care

sterilizare ale instrumentarului, sticlăriei şi materialului vegetal (tehnici care se aplică şi în cazul culturilor de calusuri şi de celule), în acest subcapitol ne vom referi numai la testarea sterilităţii culturilor de suspensii celulare.

Având în vedere rata mare de creştere a microorganismelor, comparativ, cu aceea a celulelor vegetale, orice contaminare a culturilor apare evidentă fie sub forma unei pelicule, fie sub forma unor colonii, mai ales pe suprafaţa mediului de cultură semisolid. Aceste caracteristici sunt adeseori asociate cu un miros neplăcut care se degajă din vasele de cultură decopertate, contaminarea fiind confirmată prin examinarea la microscop a unor eşantioane de mediu. În anumite situaţii, de exemplu în trierea culturilor stoc, sau în cazul inoculării unor volume mari de mediu, este indicată o maximă prudenţă în efectuarea operaţiunilor, pentru a împiedica orice posibilitate de contaminare. Identificarea germenilor prezenţi în inocul poate fi realizată prin întrebuinţarea unui mediu specific microbian (comercializat sub formă de pulbere, care se poate prepara foarte uşor), ce poate fi folosit sub formă solidă sau lichidă. Pentru aceasta, în general, sunt utilizate medii comune, cum sunt: agarul nutritiv, agarul de malţ şi mediul Czapek Dox, specific pentru fungi. Totuşi, în anumite ocazii, este necesară folosirea unor medii şi condiţii mai selective, aşa cum sunt mediile speciale utilizate pentru identificarea germenilor infestanţi prezenţi în contaminările repetate, sau cele specifice pentru actinomicete (gel din făină de ovăz).

Interesant este faptul că, suspensiile celulare vegetale nu par a fi afectate de contaminanţi intracelulari de tipul micoplasmelor, infecţii care reprezintă o problemă majoră pentru culturile de celule animale. Nu se ştie însă precis dacă acest aspect reflectă absenţa reală a contaminanţilor din culturi, ori lipsa unor metode precise de identificare a lor. Culturile lichide pot fi testate prin prelevarea din acestea a unei probe ce poate fi inoculată într-un mediu, sau pe un mediu potrivit. Astfel, dacă sunt utilizate volume mai mari de mediu, înainte de inoculare se trec 10 ml de cultură, în mod aseptic, printr-o membrană filtrantă sterilă (cu pori de 0,2 μm), membrană care reţine microorganismele şi care este plasată apoi pe un mediu de cultură solid, adecvat creşterii mai multor categorii de germeni, sau specific pentru un anumit tip de agent infestant. Volumele mici (0,5ml – 10 ml) pot fi incubate în mediu de cultură lichid, iar cele foarte mici(50 μl –500μl) pot fi dispersate pe suprafaţa unui mediu solidificat. În urma incubării (la 25°C – 30 °C) a acestor probe, pe mediile descrise anterior, după cca 1 – 3 zile, la nivelul acestora se vor dezvolta colonii microbiene vizibile. În continuare, se vor utiliza tehnicile microbiologice obişnuite de izolare, creştere şi identificare a contaminanţilor (*Stainer* şi colab.,1977).

5.4.3. Condițiile necesare pentru inducerea culturilor de calus și a suspensiilor celulare

5.4.3.1. Alegerea și prepararea explantelor

Culturile celulare vegetale pot fi inițiate atât din speciile de cormofite monocotiledonate, cât și din cele dicotiledonate. Calusul se poate dezvolta, în mod normal, din orice tip de explant, dar alegerea explantului depinde de obiectivul cercetărilor. De exemplu, cercetările de biochimie, adeseori, necesită efectuarea unei comparații între calusurile derivate din diferite plante, organe sau țesuturi, iar în cazul producției de metaboliți secundari pe primul loc, ca importanță, se clasează *specia*.

În general, se consideră că variabilitatea este asociată cu genotipul plantei utilizate pentru prelevarea explantelor. De asemenea, există o mare variabilitate *in vitro* între cultivarii ce aparțin aceleeași specii sau ce aparțin la familii diferite. Dacă este necesară efectuarea de investigații asupra nucleului, cercetările pot fi simplificate prin utilizarea de specii cu un număr mic de cromozomi. Țesuturile sau organele folosite ca surse de explante pot, de asemenea, să fie determinante în succesul sau insuccesul inducerii culturilor de țesuturi vegetale (*Seabrook*, 1980).

De cele mai multe ori, pentru inițierea calusului, materialul vegetal folosit ca explant trebuie să fie tânăr, sănătos și viguros nefiind indicată utilizarea țesuturilor plantelor care sunt pe cale de a intra în senescență. Folosirea plantulelor foarte tinere este avantajoasă și pentru inițierea calusului, în special în cazul celor provenite din semințe sterilizate și germinate aseptic (*Allan*, 1991). Din aceste motive, este necesar ca pentru inducerea de culturi calusale dintr-o anumită specie, să fie testate cât mai multe surse de explante (țesuturi și organe). Astfel, la *Berberis parvifolia* au fost utilizate – ca și material vegetal pentru inducerea calusurilor – explante de: frunză, pețiol, tulpină și rădăcină, provenite de la planta matură, intactă, precum și explante de: cotiledon, hipocotil și rădăciniță, excizate din plantule în vârstă de 16 zile, plantule provenite din semințe germinate steril. Indiferent de compoziția mediului nutritiv folosit, doar segmentele excizate din plantulă (în special cele din rădăciniță) au dat naștere la calusuri (*Deliu* și colab., 1985; *Deliu*, 1991). La *Dioscorea caucasica* a fost testată capacitatea calusogenă a mai multor tipuri de explante – de rădăciniță, hipocotile și frunzulițe – excizate din plantule provenite din semințe germinate aseptic, precum și embrioni zigotici, maturi, prelevați din semințe. Dintre toate aceste tipuri de explante, cele mai adecvate pentru inițierea calusului s-au dovedit a fi embrionii intacți, maturi, embrioni din care s-a dezvoltat, mult mai rapid

şi într-o cantitate mult mai mare, biomasa calusală (*Deliu* şi colab., 1991 a şi b; *Deliu*, 1991).

Protocolul de inducere a formării calusului de *Dioscorea caucasica*. Acest protocol este destul de simplu şi constă din mai multe etape, şi anume: a) seminţele de *D. caucasica* sunt menţinute peste noapte în apă de robinet; b) în continuare, seminţele sunt sterilizate cu hipoclorit de calciu 8%, timp de 25 min. şi apoi se spală de trei ori cu apă distilată sterilizată; c) pentru prelevarea embrionilor maturi, în regim aseptic, seminţele se despică longitudinal cu ajutorul unui bisturiu steril, iar embrionii sunt desprinşi de ţesutul înconjurător, respectiv de endosperm, şi sunt plasaţi pe un mediu de cultură semisolid, având următoarea compoziţie: mediul bazal *Murashige-Skoog* (MS) (1962), la care se adaugă 500 mg/l hidrolizat de cazeină, 1 mg/l 2,4-D şi 0,4% agar; pH-ul mediului se stabileşte, înainte de autoclavare, la 5,7; d) culturile se menţin la întuneric, la o temperatură de 25°C. După cca 2 luni, din embrioni se formează calusuri mai mari de cca 0,3 cm^3. Acestea se detaşează de ţesuturile originare şi se transferă pe medii proaspete. Mediul de cultură cel mai favorabil pentru dezvoltarea ulterioară a calusurilor este tot mediul MS, dar cu următoarele modificări: în loc de varianta originară a complexului de vitamine, utilizată de *Murashige* şi *Skoog*, se foloseşte următoarea mixtură: 1 mg/l piridoxină HCl, 5 mg/l tiamină, 1 mg/l acid nicotinic, iar concentraţia de 2,4-D din mediu va fi de 0,5 mg/l. Valoarea pH-ului mediului se stabileşte tot la valoarea de 5,7, iar concentraţia agarului va fi de 0,8% (*Deliu*, 1991).

Dacă în cazul celor două specii de plante menţionate mai sus, materialul vegetal cel mai favorabil pentru inducerea de calus a constat din ţesuturi juvenile, respectiv plantule sau embrioni, la *Phellodendron amurense* s-au folosit explante prelevate de la planta matură, deoarece nici una din seminţele utilizate nu a germinat în condiţii aseptice. Explantele au fost excizate din frunză, respectiv din limbul frunzei, din peţiol ori din baza cărnoasă a peţiolului. Dintre toate tipurile de explante testate, doar cele prelevate din baza cărnoasă a peţiolului au dat naştere la calusuri (*Deliu*, 1985; *Deliu*, 1991).

Iniţierea calusului pare uneori a fi independentă de mărimea explantului. Totuşi, acesta trebuie sa aibă o dimensiune minimă, dimensiune sub care s-a constatat că diviziunea celulelor componente nu se mai produce. În acest context, se poate efectua sterilizarea unor porţiuni mai mari de material vegetal din care se vor exciza segmente mai mici, segmente care vor fi întrebuinţate pentru inoculare.

5.4.3.2. Stabilirea compoziției mediului de cultură

De foarte multe ori, reușita cultivării *in vitro* a cormofitelor depinde, într-o mare măsură, de realizarea unor amestecuri nutritive care să corespundă compozițional, necesităților vitale ale celulelor inoculate, pentru a compensa lipsa celor mai importanți factori de care depindea existența lor in situ, la locul lor de origine, în plantele intacte. După cum s-a văzut din capitolele anterioare, evoluția și dezvoltarea *in vitro* a explantelor vegetale poate fi orientată în mai multe direcții: generare de calus, obținere de suspensii celulare sau de protoplaști, diferențierea de noi plante etc., prin modificarea compoziției mediului de cultură și prin reglarea condițiilor mediului ambiant (lumină, temperatură, aerare).

În funcție de natura țesuturilor explantate, de momentul prelevării lor, de sezon, de specie și de stadiul de dezvoltare a plantelor utilizate ca donor, de tipul de cultură pe care dorim să-l obținem, se recomandă alegerea fie a unui mediu de cultură cu utilitate mai largă, fie a unuia mai specific.

După ce explantele au fost sterilizate, dimensionate și triate, acestea trebuie plasate pe medii de cultură potrivite ca și compoziție, în cazul nostru, pentru inducerea formării de calus. După cum se cunoaște, mediile utilizate în cultivarea variatelor tipuri de explante *in vitro* se bazează pe amestecuri alcătuite din cel puțin 20 de componente, în care sunt combinate elementele anorganice cu cele organice.

Deși există numeroase lucrări în care este redată alcătuirea multor medii de cultură, credem că nu este lipsit de interes să fie prezentate și în acest volum o listă cu astfel de medii, deoarece *Owen* și *Miller* (1992) au găsit că multe date din literatura de specialitate, privind unele concentrații ale macro- și microelementelor utilizate în componența mediilor de cultură, sunt eronate (tabelul 11).

Specii diferite de plante au nevoie de medii specifice, iar țesuturile calusale, derivate din diverse părți ale plantei, manifestă cerințe nutriționale variate. De aceea, cu toate că majoritatea calusurilor și suspensiilor celulare, derivate din același explant, pot să crească în mod normal în/sau pe același tip de mediu, acest proces poate să nu aibă loc. Astfel că, atunci când este studiat un nou sistem de cultură, un mediu adecvat pentru inițierea și menținerea calusurilor sau a suspensiilor celulare poate fi obținut, uneori, doar după multe încercări experimentale.

Tabelul 11. Concentraţia (mg/l) reală a unor componente anorganice care intră în alcătuirea a cinci medii de bază, utilizate pentru culturile de ţesuturi şi celule vegetale[a] (după *Owen* şi *Miller*, 1992)

Săruri anorganice	W43	W63	MS	B5	NN
NH_4NO_3			1650		720
$(NH_4)_2SO_4$				134	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	737[c]	720	370	246[f]	185
KCl	65	65			
KNO_3	80	80	1900	2528[j]	950
KH_2PO_4			170		68
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	19[d]	19[d]		150	
Na_2SO_4	200	200[e]			
$CaCl_2$					166
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$			440	150	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	288[c]	300			
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$[b]			37,2[g]	37,2[g,k]	37,2[g]
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$			27,8	27,8[k]	27,8[m]
$Fe_2(SO_4)_3$	2,5	2,5			
H_3BO_3	1,5	1,5	6,2		10
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$			0,025	0,025	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$		0,001[f]	0,025	0,025[l]	0,025
$MnSO_4 \cdot H_2O$				10	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	6,65[c]	7	22,3		25
MoO_3		0,0001[f]			
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$			0,25	0,25	0,25
KI	0,75	0,75	0,83	0,75	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,67[c]	3	8,6[h]	2	10

[a] W43 = *White* (1943); W63 = *White* (1963); MS = *Murashige & Skoog* (1962); B5 = *Gamborg* şi colab. (1968); NN = *Nitsch* şi *Nitsch* (1969); [b] în toate mediile se utilizează cel cu două molecule de apă; [c] starea originară este forma anhidră; [d] doza originară - 16,5 mg/l; [e] originar a fost notat ca şi $NaSO_4$; [f] a fost adăugat de *Boll* şi *Street* (1951); [g] originar, cantitatea era 37,6mg/l sub formă anhidră; [h] originar a fost $ZnSO_4.4H_2O$; [i] doza era de 250 mg/l în *Gamborg* şi colab. (1976); [j] doza era de 2500 mg/l, în *Gamborg* şi colab. (1976); [k] înlocuit cu formula fierului din mediul MS (1962) (*Gamborg* şi colab. 1976); [l] originar a fost notat ca şi $CuSO_4$; [m] doza originară a fost de 0,557 g, pentru soluţia stoc

O inovaţie mai recentă, care simplifică experimentele de rutină, sunt mediile sub formă de pulbere la care este necesar doar adaosul de apă, a sursei de carbon (glucidă) şi a fitoregulatorilor de creştere. Aceste mixturi se pot obţine din comerţ şi cu toate că sunt relativ scumpe, ele sunt foarte utile atunci când se folosesc cantităţi mici dintr-un anumit tip de mediu, reducând mult din timpul necesar pentru prepararea mediilor.

Același mediu poate fi utilizat atât pentru culturile de tip semisolid, caz în care se adaugă agentul gelifiant (de exemplu agar), cât și pentru cele lichide. Agarul, care se poate procura din comerț, are grade diferite de puritate (este bine ca acesta să fie cât mai pur). El este folosit de regulă într-o concentrație de 0,75% (w/v)*. Capacitatea de gelificare a agarului variază destul de puțin în funcție de tipul acestuia. Totuși, agarul – împreună cu anumiți ioni din mediu – poate afecta morfologia calusului. Astfel, dacă agarul nu este de calitate, impuritățile din el pot deteriora – pe durata autoclavării mediului – anumite zaharuri, cum este galactoza, astfel că acest tip de mediu semisolid va fi inadecvat pentru studiul caracteristicilor creșterii țesuturilor vegetale *in vitro*. În asemenea situații, se recomandă utilizarea, ca agent de solidificare a mediului, gelritul sau mediile staționare, lichide.

La majoritatea tipurilor de medii realizate până în prezent, se cunoaște compoziția lor atât din punct de vedere cantitativ, cât și calitativ. Totuși, anumite adaosuri de suplimente a căror alcătuire nu a fost determinată încă cu exactitate, așa cum este laptele de nucă de cocos sau sucul de tomate, sunt, uneori, necesare în scopul inducerii formării calusului sau pentru a stimula creșterea acestuia. Dacă este posibil, mediile cu alcătuire definită vor fi utilizate cu precădere în subcultivarea *in vitro* a țesuturilor și celulelor vegetale. Extractele vegetale, cu compoziții nedefinite, sunt preparate prin omogenizarea materialului biologic și extragerea și filtrarea sucului. Aceste suplimente trebuie să fie preparate în cantități mari pentru a asigura uniformitatea experimentelor. De exemplu, laptele de nucă de cocos se filtrează printr-o pânză obișnuită, se fierbe timp de 15 – 20 minute, pentru precipitarea proteinelor, apoi se filtrează printr-o hârtie de filtru *Whatman* No.1 și, în final, se repartizează în recipiente adecvate și se menține la frigider, până la utilizare. Deoarece laptele de cocos este lichid, el poate fi adăugat la mediu (într-o concentrație de cca 10%), înainte de autoclavare. Motivul pentru care ameliorarea creșterii este asociată cu astfel de extracte vegetale nu este pe deplin cunoscut, dar, se presupune că ele conțin anumiți nutrienți și/sau fitohormonii cu efecte benefice asupra unor culturi. De asemenea, se cunoaște că laptele de cocos deține o anumită capacitate de tamponare și poate proteja dezvoltarea calusului de fluctuațiile pH-ului. În general, valorile pH-ului sunt ajustate înainte de autoclavare la valori cuprinse între 5,6 și 6,0.

Fitohormonii și regulatorii de creștere au importanță majoră în evoluția culturilor de țesuturi și celule vegetale. Realizarea unui echilibru adec-

* w/v = greutate per volum

vat între concentrația auxinelor și cea a citochininelor poate fi crucială pentru inițierea și stabilizarea culturii de calus, precum și pentru menținerea acestuia. Majoritatea proceselor biologice, respectiv creșterea, diferențierea și metabolismul celulelor, sunt afectate de regulatorii de creștere vegetali, astfel că, după inițierea calusului, se impune studierea efectului lor, asupra dezvoltării țesuturilor cultivate *in vitro*.

În general, pentru inducerea procesului de calusogeneză se utilizează numai auxine, așa cum sunt 2,4-D sau ANA. Totuși, nu sunt puține cazurile în care se folosesc combinații de auxine (2,4-D, ANA) și citochinine (BA, chinetină). Anumite culturi calusale și de suspensii celulare, cum sunt cele care nu necesită, timp mai îndelungat, adăugarea de hormoni vegetali pentru creșterea și menținerea acestora, după o anumită perioadă de timp, ele devenind habituate.

Zaharoza (2–5% w/v) este sursa cea mai comună de carbon organic, pentru culturile de celule și țesuturi vegetale, ea fiind preferată altor surse glucidice (glucoză, maltoză, galactoză, etc.). Natura și concentrația compusului utilizat ca sursă de carbon, pot afecta atât diferențierea, cât și metabolismul secundar, precum și creșterea și morfologia calusurilor.

În anumite cazuri, în mediile de cultură pot fi introduse și alte componente. Astfel, cărbunele activ și polivinilpirolidona se adaugă la mediile pe care sunt cultivate țesuturi ce produc și elimină cantități mari de fenoli.

5.4.4. Inițierea culturilor de calus și a suspensiilor celulare

5.4.4.1. Calusul

Inițierea formării de calus, la nivelul explantelor cultivate *in vitro*, poate fi observată ca o dilatație a zonei ce cuprinde țesuturile rănite, tăiate (fig. 49). Ea are loc după cca 5 săptămâni de la inocularea explantelor pe medii adecvate. Deoarece celulele au o densitate minimă la inoculare, după care ele pot rămâne viabile fără să crească, calusul trebuie să rămână atașat explantului timp suficient pentru ca el să ajungă la un volum de cca 0,3 cm^3. După aceea, calusul poate fi desprins de explant, cu ajutorul unui bisturiu steril, fiind apoi transferat separat, pe un mediu de cultură proaspăt.

În momentul în care s-a realizat creșterea rapidă a celulelor, se impune selecția randomică a materialului calusal, pentru ca prin subcultură să se obțină exemplare reprezentative. Tăierea calusului în porțiuni aproximativ egale permite o anumită randomizare, dar trebuie avut în vedere că celulele din centrul calusului nu se divid, sau chiar sunt moarte. Cantitatea de țesut care este subcultivat trebuie menținută cât de cât constantă.

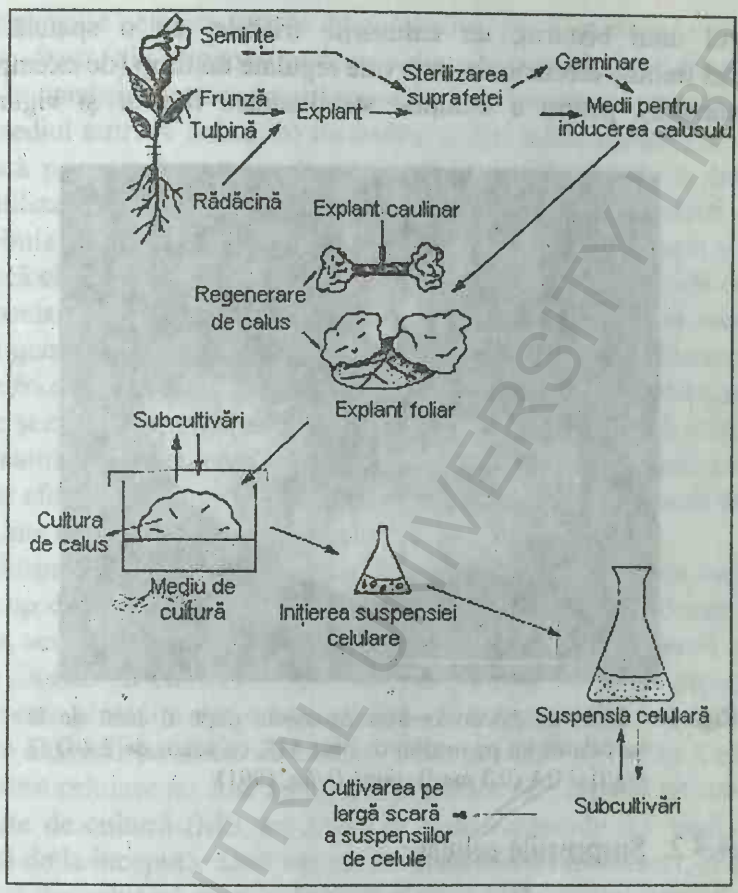


Fig. 49. Schema inițierii culturilor de calus și a celor de suspensii celulare (după *Allan*, 1991, modificată de *Deliu*)

Variate țesuturi au capacități diferite de regenerare. Totuși, un calus de 2 cm^3 (așa cum se poate observa și din figura 50, imagine care redă dimensiunea atinsă de calusul de *Phellodendron amurense* după o lună de la inoculare) poate fi divizat în patru sau șase fragmente (*Deliu*, 1985; *Deliu*, 1991).

Perioada de subcultivare a calusului variază de la trei la cinci săptămâni, în funcție de rata de creștere a acestuia. Subcultivarea calusului este, fără nici un dubiu, selectivă (atât în mod deliberat, cât și inconștient), iar selecția poate fi considerată ca fiind efectuată după primul transfer. Este indicat ca să se inițieze un număr cât mai mare de linii calusale, pe durata subcultivării inițiale, deoarece atunci, probabil, gradul de variabilitate atins este cel mai ridicat. Pentru subcultivare, calusurile compacte sunt divizate

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cu ajutorul unui bisturiu, iar calusurile friabile, cu o spatulă. Aceste subcultivări trebuie efectuate la intervale regulate de timp (de exemplu din 4 în 4 săptămâni), pentru a menține stabilitatatea liniilor și vigurozitatea acestora.

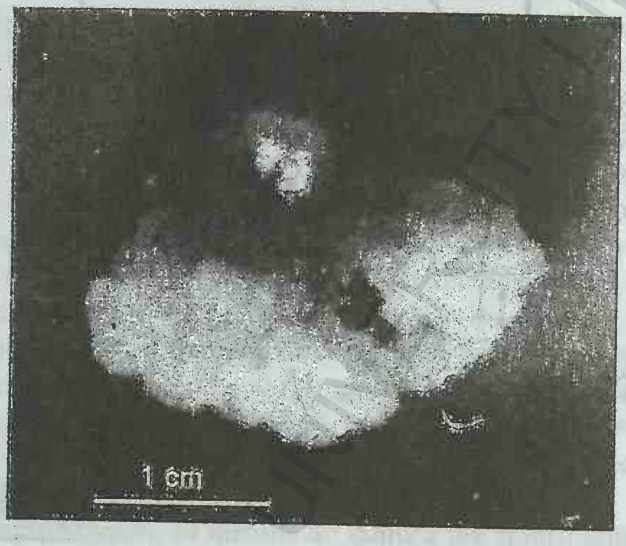


Fig. 50. Calus de *Phellodendron amurense* după o lună de la inocularea lui pe mediul de bază MS, cu adaos de 2,4-D (2 mg/l) și BA (0,3 mg/l) (după *Deliu*, 1991)

5.4.4.2. Suspensiile celulare

Procedura de obținere a calusului și a suspensiilor celulare este destul de simplă, pentru anumite specii, și a fost redată schematic în figura 49. Unul dintre dezavantajele culturilor celulare vegetale constă în densitatea celulară mică la inoculare, astfel că, în mediul de cultură proaspăt trebuie să existe un număr minim de celule (sau de produși ai metabolismului lor), pentru ca diviziunea celulară să aibă loc. Dacă nu se realizează acest deziderat, în cultură se va instala o *fază de lag* (sau de întârziere) prelungită a creșterii culturilor, pe durata căreia sunt sintetizați compușii necesari pentru diviziunea celulelor. Natura acestor compuși citochinetici, care se produc pe perioada *fazei de lag*, nu este cunoscută. Culturile de țesuturi și de suspensii celulare pot fi induse și prin adăugarea în mediul de cultură proaspăt, înainte de inoculare, a unei cantități din mediul în care acestea au crescut, în prealabil; un astfel de mediu poate fi denumit "mediu condiționat".

Suspensiile celulare induse de cormofite, pot fi inițiate în două moduri: a) fie *direct*, din explante prelevate din plantule obținute din semințe germinate în condiții aseptice (cazul morcovului), explante care sunt plasate direct în mediul nutritiv lichid; b) fie *indirect*, din calus, introdus în mediul lichid. Dacă prima cale este mult mai puțin folosită, cea de a doua este frecvent utilizată pentru inducerea majorității suspensiilor celulare. Astfel, calusul trebuie menținut pe mediul semisolid, pe durata a cel puțin 6 sau 10 pasaje. Dacă el va crește cu o rată foarte constantă în acest interval de timp, procesul constituie un indiciu al adăptării țesuturilor calusale la mediul de cultură. În general, pentru obținerea suspensiilor celulare se utilizează calusuri foarte *friabile*. Desigur că, pentru inițierea culturilor de celule se poate întrebuința și calus dur, compact, dar, în acest caz, este necesară secționarea acestuia, înainte de inocularea lui în mediul lichid. De asemenea, este bine să fie testat efectul mai multor medii de cultură, în scopul obținerii de calus friabil, înainte de inițirea suspensiei celulare.

Calusurile friabile se pot obține chiar dacă țesuturile sunt menținute pe același tip de mediu, dar se impune efectuarea de selecții succesive. Un exemplu în acest sens, îl reprezintă calusurile induse din embrionii zigotici maturi de *Dioscorea caucasica*, calusuri care inițial aveau un aspect marmorat. Ele erau alcătuite din mase celulare de culoare crem, de consistență moale, care alternau cu altele de culoare albă, tari (*Deliu*, 1991). Cele două tipuri de mase celulare au fost apoi izolate și cultivate separat pe un același tip de mediu de cultură (MS, cu 2,4-D în concentrația de 0,5 mg/l, mediu utilizat încă de la început), dând naștere la două tipuri de calusuri, și anume: unul alcătuit din calusuri crem și friabile și altul alcătuit din calusuri albe și dure. După un interval de cca 6 luni, timp în care s-a efectuat același tip de selecție (după culoare), în paralel cu subcultivările succesive ale calusurilor, cele două tipuri sau linii calusale s-au transformat în sușe calusale veritabile. Acest proces s-a confirmat ulterior, deoarece, transferate pe același mediu descris mai sus și fără intervenția procesului de selecție, cele două sușe și-au păstrat toate caracteristicile dobândite (culoare, creștere, sinteza de metaboliți primari și secundari etc.) pe o perioadă nedefinită de timp (fig. 51) (*Deliu* și colab., 1991 a; *Deliu*, 1991).

În majoritatea cazurilor, dispersia celulelor a fost asigurată prin introducere unor porțiuni mici de calus friabil în vase cu mediu de cultură lichid. Ulterior, aceste vase vor fi plasate și menținute pe un agitator rotativ orizontal. În general, după cca 2-4 săptămâni de la inocularea calusurilor pe medii lichide, se poate observa că din fragmentele de calus se detașează agregate celulare, mai mari sau mai mici, și celule libere (vezi fig. 49). Dacă

țesuturile calusale au fost bine alese și nu sunt recalcitrante la dezagregare, după mai multe transferuri succesive, în același tip de mediu, se va obține o cultură celulară adevărată. Cultura este formată, chiar la suspensiile cele mai fine, din celule libere și din agregate celulare.

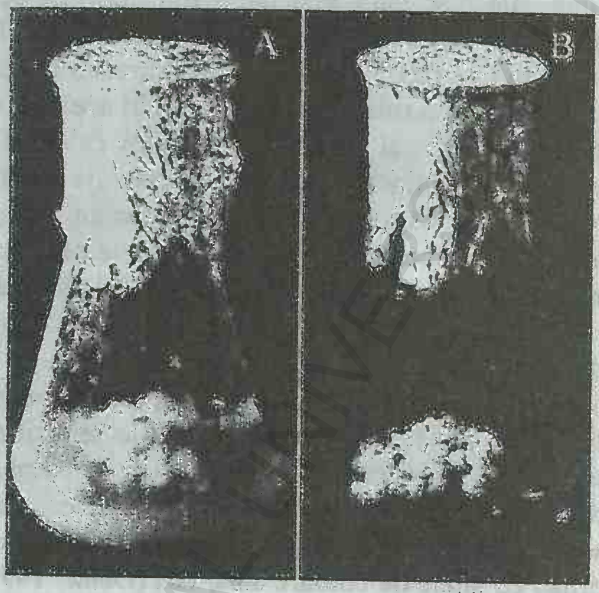


Fig. 51. Calusuri de *Dioscorea caucasica* crescute pe mediul MS, cu 2,4-D (0,5 mg/l). A= suşă calusală crem, friabilă; B = suşă calusală albă, compactă (după *Deliu*, 1991)

În cazul culturilor celulare, în subcultivări, este foarte importantă stabilirea raportului dintre mărimea inoculului (care depinde de densitatea celulară a suspensiilor din care se prelevează inoculul) și mediul proaspăt. În general, se consideră că densitatea celulară optimă la care trebuie să se ajungă după inoculare este cuprinsă între 0,5 - 2,5 x 10^5 celule ml^{-1}. Subcultivările se realizează la intervale egale de timp. Durata intervalelor de subcultivare va depinde de viteza de creştere a culturilor celulare și poate varia de la una, până la trei săptămâni. De multe ori, inițierea unei suspensii celulare se realizează greu din cauza slabei separări a celulelor din agregate. În astfel de situații se recomandă fie adăugarea la mediul de cultură a unor enzime care lizează lamela mijlocie, așa cum este pectinaza, fie retransferarea agregatelor celulare din mediul de cultură lichid, pe un mediu de cultură solidificat.

În cazul în care suspensiile celulare conțin foarte multe agregate, se pot utiliza vase cu zimți care dezagregă aceste grupuri de celule. Ideal, sus-

pensiile ar trebui să fie alcătuite numai din celule singure (sinonime utilizate – singulare, libere, unice, solitare, autonome sau individuale), dar acest fenomen se întâlneşte extrem de rar. Proporţia relativă dintre numărul celulelor libere şi numărul de agregate celulare variază considerabil, în funcţie de cultura celulară. Astfel, s-au obţinut unele culturi celulare, ca cele de *Morinda citrifolia*, care sunt foarte omogene şi sunt alcătuite din celule libere sau din mănunchiuri de câte două celule, într-o proporţie de 60% (*Zenk* şi colab., 1975). Totuşi, în multe suspensii celulare, majoritatea agregatelor celulare pot să aibă dimensiuni cuprinse între 1 şi 2 mm în diametru. Mărimea acestor agregate celulare depinde de tiparul de diviziune a celulelor vegetale aflate în suspensie. Diviziunile repetate au ca rezultat formarea de grupuri de celule, grupuri care care vor fi reţinute între ele prin lamela mijlocie şi prin plasmodesme. În cultura de *tip "batch"* (sistem închis), la sfârşitul fazei de diviziune a celulelor, continuarea creşterii în volum a acestora poate face posibilă separarea celulelor din agregate, astfel că gradul de agregare celulară, în acest sistem, poate varia considerabil. Agregatele mai mari pot fi, treptat, eliminate prin trecerea suspensiei, înainte de subcultivarea ei, prin site cu ochiuri de 0,1 – 0,5 mm.

În mod normal, culturile de celule cresc mult mai bine decât culturile de calus şi sunt, din punct de vedere morfologic, mai omogene. Pentru subcultivarea suspensiilor celulare vegetale, laboratoarele de culturi de ţesuturi şi celule vegetale utilizează diferite protocoale, în funcţie de scopul urmărit. Astfel, aceste transferuri pot fi folosite doar pentru menţinerea culturilor, în general, sau numai a unor linii celulare stabile, în special. Fără îndoială că stabilitatea culturii are o foarte mare importanţă pentru reproductibilitatea culturilor.

Aşa cum am mai arătat, suspensiile celulare vor trebui subcultivate atunci când ele se află într-un anumit stadiu al ciclului lor de creştere şi acesta este cuprins, în general, între sfârşitul fazei *lineare* şi începutul fazei *staţionare* de evoluţie a culturii. Subcultivările se realizează prin transferarea unui volum fix de suspensie (prelevat din cultura ajunsă într-un stadiu adecvat de creştere), într-un mediu nutritiv proaspăt, la intervale constante de timp.

Pe măsură ce cultura se "maturizează", respectiv se stabilizează şi atinge o densitate celulară maximă, raportul dintre volumul inoculului şi cel al mediului de cultură proaspăt poate fi micşorat treptat, fără a se depăşi, în sens negativ, pragul unei densităţi minime la inoculare. De exemplu, în momentul iniţierii suspensiilor celulare de *Berberis parvifolia*, raportul dintre inocul şi mediul proaspăt a fost de 1:3, raport care a putut fi scăzut, treptat,

până la 1:8, în special la liniile care prezentau – spre sfârşitul ciclului lor de creştere, respectiv în momentul când trebuiau transferate – o densitate celulară maximă (*Deliu*,1991; *Deliu* şi colab., 1994 b). Acest raport poate varia în funcţie de specie şi de caracteristicile liniei celulare utilizate în experimente şi, mai ales, de nivelul ratei specifice de creştere a acesteia. Totuşi, la *Digitalis lanata*, raportul optim inocul/mediu, chiar la liniile celulare cu o rată specifică de creştere destul de mare, a rămas de minimum 1:5,5 (*Deliu* şi colab., 1998). Deoarece păstrarea unor linii sau suşe celulare, cu caracteristici deosebite, este extrem de importantă, se recomandă ca dubluri ale acestora să fie menţinute pe alte agitatoare, pentru a preîntâmpina apariţia unor posibile defecţiuni mecanice.

În general, forma şi structura celulelor aflate în suspensiile derivate din calus este asemănătoare cu aceea a celulelor parenchimatice. Totuşi, aceşti parametri pot depinde foarte mult şi de alcătuirea mediului de cultură şi de specie. Astfel, s-au obţinut culturi celulare de fasole, în care celulele erau în general sferice (de 12-40 μm în diametru), pe când în suspensiile celulare de tutun s-au observat celule gigantice, alungite (având un diametru de 300 μm), peste 2,5 mm lungime. Celulele alungite, sau tubulare, apar în special în mediile în care se adaugă lapte de cocos sau hidrolizat de cazeină. Izolarea unor clone celulare de morcov, cu diferite nivele de ploidie, indică faptul că dimensiunea celulelor creşte o dată cu mărirea acestui nivel, iar în culturile în care celulele sunt în majoritate aneuploide, acestea etalează un procent ridicat de forme curioase (*Street*, 1977).

Diversitatea formelor de celule este mult mai mare spre sfârşitul ciclului de creştere a culturilor celulare. Astfel, cu toate că în mediul de cultură al suspensiilor celulare de *Berberis parvifolia* nu se află încorporate nici unul din ingredientele amintite de *Street* (lapte de cocos sau hidrolizat de cazeină), s-a constatat că celulele prezentau forme şi mărimi diferite, de la sferice şi mici, la cele mari, ovale sau cilindrice (fig. 52) (*Deliu*, 1991). Având în vedere aceste aspecte, se poate trage concluzia că pentru iniţierea şi menţinerea unei suspensii celulare, este foarte important să se ţină seama de toţi factorii care pot să influenţeze procesele de multiplicare şi de creştere a celulelor vegetale.

Individual, celulele plantelor sunt mult mai mari decât celulele microorganismelor, dar în cazul unei suspensii, acestea pot fi considerabil mai variate ca formă şi mărime, de la o conformaţie aproape sferică, la una aproximativ cilindrică. În general, dimensiunile lineare ale celulelor vegetale cultivate *in vitro* sunt cuprinse între 20 – 40 μm în diametru şi între 100 – 200 μm în lungime. Astfel, volumul de bază a acestora este de 100 – 200 de

ori mai mare decât cel al microorgonaismelor. De aceea, prin comparație, procesul de transfer al substanțelor în celula vegetală este mult mai mare, iar ratele metabolice, în timp, sunt mult mai mici, în comparație cu cele ale microorganismelor.

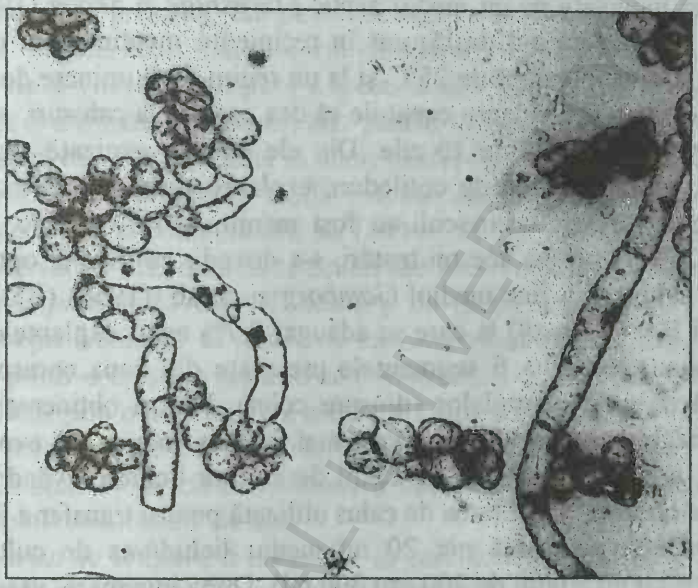


Fig. 52. Suspensii celulare de *Berberis parvifolia* aflate în stadiul staționar al ciclului lor de creștere (ziua a 14-a). Mediul de cultură: *Gamborg* și colab. (1968) cu adaos de ANA (1,5 mg/l) și BA (0,3 mg/l) (după *Deliu*, 1985)

Celulele vegetale posedă un perete celular rigid, perete care – în condițiile cultivării lor *in vitro*, sub formă de suspensii – este destul de subțire (0,2 - 0,6 μm în grosime). Această particularitate va permite, printre altele, ca spre sfârșitul ciclului de creștere al culturilor celulare, volumul vacuolei să se mărească foarte mult. Toate aceste trăsături fac ca celula vegetală să fie sensibilă la *stresul hidrodinamic*. Astfel, când suspensiile celulare sunt agitate la o viteză mică (50–200 r.p.m.), celulele nu sunt distruse, dar – la o asemena viteză – mixarea culturilor este destul de slabă, ceea ce poate afecta metabolismul celular (*Wilson*, 1980).

Pentru o mai bună înțelegere a modului de obținere a unei suspensii celulare vom prezenta în cele ce urmează, un exemplu în acest sens, și anume, cel al culturilor celulare de *Berberis parvifolia*, culturi obținute din plantule dezvoltate din semințe germinate în condiții aseptice.

Protocolul de lucru pentru inducerea suspensiilor celulare de *Bereberis parvifolia*. Semințe de *Berberis parvifolia* Sprague au fost sterilizate cu o soluție de hipoclorit de Ca 9%, timp de 25 min. și apoi au fost spălate – de trei ori – cu apă distilată, sterilă. Pentru germinare, semințele au fost inoculate pe un mediu asptic *Murashige* și *Skoog* (1962) ½, cu 5% agar. Germinația s-a desfășurat în recipiente menținute în camera de vegetație, la o temperatură de 25°C și la un regim de iluminare de 16 ore/zi. Pentru selectarea de explante capabile să dea naștere la calusuri, au fost utilizate plantule în vârstă de 16 zile. Din ele au fost excizate segmente de rădăciniță, de hipocotil și de cotiledon, explante care au fost inoculate pe medii diferite. Vasele cu inoculi au fost menținute la întuneric, la temperatura de 25°C. În urma acestei testări, s-a dovedit că mediul optim pentru inducerea calusului a fost mediul *Gamborg* și colab. (1968) (B5), cu ANA (2 mg/l) și BA (0,2 mg/l) la care se adăugat 0,7% agar; explantele cele mai adecvate s-au dovedit a fi segmentele prelevate din zona corespunzătoare bazei rădăcinițelori plantulelor (dinspre colet). Pentru obținerea culturilor celulare, fragmente din calusurile cele mai friabile, induse din explantele de rădăciniță, au fost transferate în medii de cultură lichide, având o aceeași compoziție chimică. Cantitatea de calus utilizată pentru transfer a fost de cca 0,5 g substanță proaspătă per 20 ml mediu lichid/vas de cultură (vase *Erlenmeyer*, cu un volum de 200 sau 300 ml). După inoculare, vasele au fost plasate pe un agitator rotativ, în plan orizontal (100 rpm), la întuneric și la o temperatură de 25°C. După 3 – 4 transferuri succesive (efectuate la intervale de trei săptămâni), pe un același tip de mediu, și cu o rată a diluției de 1:2, s-a observat formarea unor suspensii celulare veritabile, alcătuite din agregate celulare mai mici de 1 mm în diametru și multe celule libere. În urma rezultatelor obținute s-a dovedit că cel mai bun mediu, atât pentru creșterea și multiplicarea celulelor de *Berberis parvifolia* cultivate *in vitro*, cât și pentru sinteza metaboliților secundari (alcaloizi izochinolinici), a avut următoarea alcătuire: nutrienții anorganici după rețeta dată de *Gamborg* și colab. (1968) (B5), la care s-au adăugat zaharoză (30 g/l), mezo-inozitol (100 mg/l), tiamină HCl (5 mg/l), acid nicotinic (1 mg/l), piridoxină HCl (1 mg/l), ANA (1,5 mg/l) și BA (0,3 mg/l). Valoarea pH-ului, stabilită – înainte de autoclavare – a fost de 5,5. Vasele de cultură au fost menținute în aceleași condiții descrise mai sus, iar raportul dintre inocul: mediu de cultură proaspăt a fost de 1:4, raport care, ulterior, a putut fi crescut în mod treptat, până la 1:8 (*Deliu*, 1991; *Deliu* și colab., 1994 a).

5.4.5. Caracteristicile culturilor calusale şi ale suspensiilor celulare

5.4.5.1. Creşterea şi dezvoltarea calusului

Calusul se prezintă, din punct de vedere morfologic şi anatomic, ca un material vegetal mult mai uniform comparativ cu ţesuturile plantelor intacte, iar rata şi viteza de creştere a acestuia este mult mai mică. Astfel, calusurile pot fi utilizate, cu succes, atât pentru menţinerea şi stocarea germoplasmei, cât şi ca sisteme model în unele studii de biologie celulară teoretică sau aplicată. Cele mai multe studii privind dezvoltarea calusului au fost efectuate de *Street* şi colaboratorii săi (*Street*, 1977). În urma acestor cercetări s-a observat că dezvoltarea calusului are loc în două faze: a) aşa numitele reacţii sau *răspunsuri la rănire* (*wound)* şi b) *reacţii de creştere*.

Reacţia calusului la rănire se carcaterizează prin diviziuni celulare limitate şi printr-o creştere rapidă a activităţii metabolice, ceea ce nu va conduce, implicit, şi la o dezvoltare a acestuia. După cum am mai avut ocazia să precizăm, prima relatare despre răspunsul la rănire a ţesuturilor vegetale a fost dată în anul 1756, când *Duhamel* a observat apariţia unei îngroşări la nivelul tulpinii decorticate de ulm.

Reacţia de creştere a calusului se caracterizează printr-o continuare a diviziunilor celulare, pentru o anumită perioadă de timp. După ce au fost descoperiţi fitohormonii şi a fost intuit rolul lor fiziologic, s-a înţeles că reacţia de creştere este, în mod normal, dependentă de aprovizionarea celulelor calusale cu auxine endogene. În cazul ţesuturilor vegetale cultivate *in vitro*, reacţia de creştere depinde, în special, de natura şi concentraţia regulatorilor de creştere vegetali prezenţi în mediul de cultură.

Dezvoltarea calusului este, de fapt, un răspuns natural al ţesuturilor plantelor la rănire, reacţie care se caracterizează printr-o diviziune rapidă a celulelor din vecinătatea rănii, acestea formând un strat care acoperă rana (suber de cicatrizare). În asemenea procese este implicată şi activitatea metabolică, care se măreşte rapid (de exemplu producţia de polifenoli, necesari pentru consolidarea peretelui celular), fiind sintetizaţi şi o serie de compuşi de protecţie a zonei rănite împotriva instalării ciupercilor patogene, aşa cum sunt enzimele chitinazice, enzime care hidrolizează chitina ce intră în alcătuirea peretelui celular al ciupercilor. Procesul în urma căruia are loc inducerea diviziunii celulelor latente (celule diferenţiate care nu se divid), în scopul formării unui strat protector, nu este pe deplin cunoscut, dar se presupune că el rezultă în urma interacţiunii hormonilor eliberaţi din celulele rănite. Practic vorbind, această informaţie poate fi luată în considerare din

momentul excizării explantelor, deoarece mărirea raportului dintre suprafața ariei secționate și volumul explantului face posibil accesul hormonilor în celule. De aceea, mulți cercetători consideră că este necesar ca explantul să fie crestat în mai multe locuri, pentru a se stimula răspunsul favorabil al țesuturilor la rănire.

Reacția, sau răspunsul de creștere, a fost divizată în trei stadii (sau etape), care sunt caracterizate prin modificări ale dimensiunii celulelor și ale metabolismului celular, modificări ce conduc, în final, la producerea calusului. Aceste stadii au fost denumite astfel: stadiul de *inducție* (când celulele se pregătesc pentru diviziune, prin intervenții ale anumitor modificări metabolice și prin sinteza de macromolecule), stadiul de *diviziune* (când celulele devin meristematice, se divid activ și, în consecință, scad în volum) și stadiul de *diferențiere* (stadiu controversat, într-o anumită măsură) (*Bayllis*, 1985). În acest ultim stadiu, celulele cresc în volum și se vacuolizează intens, iar rata diviziunilor scade, ajungându-se astfel la un echilibru între creșterea în volum și diviziune. Procesul de diferențiere este cel mai des urmărit, în scopul descrierii schimbărilor ce au loc în celule, schimbări care conduc la apariția celulelor specializate, celule ce vor alcătui țesuturi definitive, așa cum sunt xilemul sau floemul. Răspunsul la rănire sau cel de creștere este implicat în transformarea celulelor specializate în celule de tip meristematic, din care se va forma calusul. De cele mai multe ori, calusul se formează la nivelul țesuturilor excizate, la baza segmentelor caulinare sau la marginea segmentelor de frunze.

5.4.5.2. Heterogenitatea calusului și a suspensiilor celulare

5.4.5.2.1. *Heterogenitatea calusului*

Rolul cheie pe care îl deține calusul în obținerea culturilor celulare vegetale, precum și importanța menținerii lui în condiții controlate, a fost deja subliniat. Totuși, trebuie să se țină seama și de heterogenitatea care există atât între diferitele calusuri, cât și aceea prezentă în interiorul calusului. Heterogenitatea celulelor din calusurile stabilizate ca dezvoltare se prezintă sub diferite aspecte, cum sunt: culoarea, morfologia, structura, creșterea și metabolismul. Chiar și un calus aparent uniform (sub aspect macroscopic) poate să conțină celule cu nivele diferite de ploidie și cu o capacitate metabolică diferită. După *Allan* (1991), heterogenitatea calusurilor se poate datora:

- genotipului utilizat;
- tipului de țesut sau de celule întrebuințate pentru inițierea calusului;

- condițiilor și metodelor folosite pentru inițierea și menținerea calusului, prin efectuarea de subcultivări succesive.

Calusul indus din diferite tipuri de celule va fi un *calus mixt*. În general, un anumit tip de celule, și anume celulele care etalează o creștere puternică și rapidă, va reprezenta tipul dominant de celule din calus. În anumite cazuri, acest proces poate fi controlat. Un exemplu în acest sens, îl reprezintă culturile din rădăcină de mazăre (*Pisum sativum*) care au fost crescute pe mediu cu adaos de 2,4-D și de extract de drojdie. Calusul rezultat va conține celule diploide, tetraploide și octoploide, iar dacă din mediu este exclus extractul de drojdie, calusul a fost alcătuit doar din celule diploide (*Burgess*, 1985).

Morfologia calusului este dependentă de modul de creștere al acestuia. Astfel, la calusurile cu creștere rapidă, celulele rezultate din diviziune sunt împinse în sus, respectiv spre exteriorul masei calusale, astfel că între celule noi și substratul de creștere se stabilesc anumiți gradienți. În cadrul acestor gradienți sunt incluși nutrienții (inclusiv gaze), regulatori de creștere vegetali, produși ai metabolismului propriu etc., și, probabil că, în acest mod, în interiorul țesuturilor calusale se creează "microclimate". Asemenea gradienți și microclimate pot afecta tiparul de creștere, de exemplu, prin stimularea ori prin inhibarea diviziunii celulelor sau a măririi acestora în volum. În orice sistem închis, unde nutrienții nu sunt reîmprospătați și metaboliții nu sunt îndepărtați, preîntâmpinarea unor astfel de variațiuni este imposibilă. Heterogenitatea existentă în interiorul unui calus ilustrează importanța selecției întâmplătoare intervenite pe durata subcultivărilor repetate, iar heterogenitatea dintre calusuri poate fi redusă folosindu-se doar protocolul normal de subcultivare. Totuși, această heterogenitate scade în timp, astfel că pe parcursul efectuării subcultivărilor succesive, poate fi atinsă o anumită stabilitate a calusurilor (*Allan*, 1991).

5.4.5.2.2. *Heterogenitatea suspensiilor celulare*

Cultura de celule vegetale este heterogenă fiind alcătuită din populații diverse de celule aflate în stadii fiziologice deosebite, populații ce pot reacționa diferit atât la factorii de mediu din interiorul vaselor de cultură, cât și la cei din exterior. Heterogenitatea metabolică a suspensiilor celulare, în sensul celei observate la calus, este mult mai redusă, celulele – pe perioada de cultură – fiind imersate într-un mediul nutritiv lichid. Cu toate acestea, omogenitatea absolută nu poate fi atinsă deoarece, într-un astfel de mediu, celulele plantelor au tendința să crească sub formă de agregate. S-au sem-

nalat şi cazuri în care s-au obţinut culturi de suspensii formate doar din celule solitare. Totuşi, în mod normal, asemenea culturi alcătuite din celule singulare nu durează mult şi până la urmă, treptat, în mediu se formează mici agregate. În concluzie, calitatea unei suspensii celulare este caracterizată ca fiind "bună", în funcţie de mărimea agregatelor.

După *Lindsey* şi *Yeoman* (1985) originea heterogenităţi culturilor celula-re vegetale este complexă şi se referă la:

a*) heterogenitatea spaţială* – care există în interiorul explantului sau a populaţiilor de celule aflate într-un anumit punct al ciclului lor de creştere;

b) *heterogenitatea temporală* – care se produce pe timpul ciclului de creştere al culturilor, sau pe parcursul efectuării de subcultivări operate succesiv.

Factorii care pot conduce la apariţia unei heterogenităţi a culturilor:

- factorii genetici
  - *mutaţiile* – deoarece sunt destul de puţine date care să ateste faptul că mutaţiile care apar spontan pot să reducă sau să elimine potenţialul biosintetic al unei culturi, acestea trebuie să îndeplinească anumite criterii: a) să fie ireversibile şi să implice o modificare în structura primară a ADN-ului; b) să fie rare; c) să se producă randomic; şi d) să fie veritabile;
  - *aberaţiile cromozomiale* – sunt cea mai mare sursă a heterogenităţii genetice în cazul culturilor celulare vegetale (*Bayliss*, 1980). Principalele modificări ale cariotipului au fost clasificate după cum urmează: a) aberaţii datorate anomaliilor fusului de diviziune care conduc la modificări ale cantităţii de ADN şi ale numărului de cromozomi, cu retenţia numărului originar de cromozomi (*poliploidie*), sau cu pierderea unor cromozomi individuali (*aneuploidie*); b) aberaţii datorate clivării cromozomilor, ceea ce conduce la modificarea cantităţii de ADN per cromozom, aşa cum se întâmplă în *translocaţii*; c) aberaţii prin endoreduplicaţii care conduc la mărirea circumferinţei cromozomilor şi a cantităţii de ADN, fără modificarea numărului acestora (*politenie*). Dintre componentele mediului se consideră că 2,4-D-ul poate să provoace *aneuploidii* (*Bayliss*, 1980).
- presiunea selecţiei – în mod curent, sunt alese acele condiţii de cultură care să conducă la o rată de creştere maximă a acestora, fiind astfel selectate celule capabile de o proliferare rapidă. Un exemplu în acest sens sunt culturile celulare de *Vicia hajastana,* care sunt constituite, la început, dintr-un număr foarte mic de celule diploide. După o perioadă de 12 luni de subcultivări succesive, pe un acelaşi tip de mediu, frecvenţa

celulelor diploide prezente în cultură a crescut la 91%, ceea ce indică o puternică presiune a selecției, pentru celulele diploide (*Singh* și colab., 1972);

- factorii de mediu - exprimarea potențialului de dezvoltare al unei culturi este produsul interacțiunii dintre genomul celulelor și mediu, reglarea genelor putând fi modulată de factorii externi, care se referă la *macromediu* (mediul de cultură) și *micromediu* (care se formează în interiorul agregatelor celulare). Macromediul poate să determine atât gradul de agregare al celulelor, cât și rata de creștere a culturilor celulare, ambele fiind în continuă modificare, pe tot parcursul ciclului de creștere;
- natura modificării metabolice – se referă la *habituare* (sau habituație), care este un proces progresiv de schimbare a metabolismului, considerându-se că acest proces are la bază mai degrabă modificări epigenetice, decât genetice. Habituarea poate să apară spontan, dar poate fi și indusă prin manipularea factorilor de mediu, așa cum este cazul variațiilor de temperatură (șoc termic). Ea se caracterizează prin pierderea dependenței celulelor vegetale cultivate *in vitro* față de auxine (*habituare auxinică*), ori față de citochinine (*habituare citochininică*), sau față de orice tip de hormon vegetal (*habituare hormonală*), ori față de *vitamine*.

Durata perioadei de creștere dintre două transferuri efectuate în mediul proaspăt, precum și compoziția mediului în fitohormoni, par a fi mijloacele de reglare a alcătuirii citologice a culturilor de celule și pot mări capacitatea de a menține culturi celulare, genetic definite.

Pentru ca această heterogenitate să fie cât mai limitată, s-a pus problema sincronizării fazelor de diviziune a celulelor aflate în cultură, sub formă de suspensii. Utilizarea culturilor celulare sincrone oferă o serie de avantaje, dintre care uniformitatea răspunsului populațiilor de celule, la un anumit stimul, oferă cercetătorilor un excelent instrument experimental pentru studierea unor fenomene genetice și a unor procese biochimice. Sincronizarea se realizează prin inhibiția sintezei de ADN, într-o anumită fază a diviziunii celulare (G_1), prin tratarea celulelor – pentru o anumită durată de timp (12 - 24 ore) – fie cu 5-aminouracil, hidroxiluree, fluorodeoxiuridină, fie cu timidină sau colchicină, administrate în diferite concentrații.

5.4.5.3. Variabilitatea culturilor celulare vegetale

Pe durata inițierii culturilor calusale, precum și în primele săptămâni de creștere a suspensiilor celulare, are loc un proces intrinsec de selecție. Este bine cunoscut faptul că în cadrul unei culturi, populațiile de celule care o alcătuiesc prezintă o *variabilitate fenotipică*. Celulele adaptate la condițiile mediului fizic și chimic (nutrienți) au timpul de dublare cel mai scurt. Ele vor deveni predominante și, în scurt timp, întreaga populație de celule aflate în cultură va fi alcătuită din acest tip de celule.

Variabilitatea morfologică observată în cazul celulelor vegetale cultivate *in vitro*, se poate datora – într-o oarecare măsură – faptului că, în general, suspensiile celulare cresc în mod *asincron*. Din acest motiv, cultura va fi alcătuită, permanent, din celule aflate în diferite faze de ale ciclului lor celular. Totuși, astfel de variații pot, de asemenea, să reflecte și diversitatea biochimică sau genetică a celulelor vegetale.

Așa cum arătam mai sus, culturile de țesuturi și celule sunt induse și menținute, în mod normal, pe medii complexe care conțin auxine și citochinine. În lipsa uneia din aceste categorii de hormoni vegetali, sau a ambelor, celulele ar trebui să moară. Cu toate acestea, pe durata subcultivărilor repetate, s-a observat adeseori apariția spontană sau indusă a culturilor hormon habituate. Baza moleculară a acțiunii hormonilor nu a fost încă descifrată și, de aceea, natura genetică sau fiziologică a modificărilor legate de creșterea hormon-independentă poate fi numai presupusă. Faptul că habituarea este un proces reversibil, ne conduce la presupunerea că el nu este determinat genetic.

În privința *selecției* de *linii celulare rezistente la toxine* metabolice, au apărut mai multe lucrări în care este redată posibilitaea izolării acestora. În asemena lucrări, nu se fac referiri la necesitatea aplicării nici unui tratament specific mutagen, pentru inducerea unor astfel de variații; ele pot apare spontan, în cultură. Aplicarea unei selecții în scopul obținerii de linii rezistente, de exemplu, la aminoacizi analogi, la ierbicide sau la antibiotice, are ca efect inhibiția temporară a creșterii culturii, în diviziune intrând doar celulele rezistente la condițiile nou create. Mecanismele implicate în dobândirea acestei rezistențe sunt multiple și includ atât inhibiția absorbției în celule a compușilor amintiți mai sus, cât și mărirea activității anumitor enzime, care îi pot descompune, mărire datorată – în parte – controlului transcripțional, sau modificării numărului de copii ale secvenței codificate (*Stafford*, 1991).

În ultimul timp au apărut numeroase publicații care s-au ocupat de studiul obținerii de metaboliți secundari prin intermediul suspensiilor celulare vegetale. Rezultatele obținute atestă că și în acest caz pot să apară spontan variante (sau linii celulare), cu diferite aptitudini (cantitative și calitative) de a produce compuși secundari de metabolism. Această variabilitate a conținutului în astfel de metaboliți apare atât în cadrul populațiilor de celule care intră în alcătuirea unei culturi, cât și în cadrul aceleași linii, pe durata efectuării de subculturi succesive. Un exemplu în acest sens îl constituie culturile de suspensii celulare de *Berberis parvifolia* ale căror celule acumulează diferite nivele de alcaloizi berberinici, metaboliți secundari de culoare galbenă. După acest criteriu al intensității culorii galbene a celulelor, s-a reușit selectarea mai multor linii celulare care sintetizează cantități diferite de alcaloizi berberinici (*Deliu*, 1991; *Deliu* și colab., 1994 b).

Una dintre problemele majore care apare în cazul variabilității culturilor de țesuturi și celule vegetale este dacă aceste variații sunt de *natură genetică* sau *epigenetică*. Pentru ca o variantă celulară – apărută într-o cultură de țesuturi sau de celule – să aibă la bază modificări genetice, ea trebuie să fie stabilă pe parcursul a numeroase generații de subcultivări succesive, în absența presiunii exercitate de selecție, chiar dacă se schimbă condițiile de cultură. Persistența caracteristicilor unei astfel de variante, în aceste condiții, poate fi denumită "veritabilă", dar nu înseamnă că este neaparat genetic determinată. Pentru demonstrarea unei astfel de posibilități sunt necesare foarte multe investigații printre care și acelea de a regenera, din culturile de celulele nediferențiate, plante fertile.

Termenul de modificări epigenetice a fost frecvent întrebuințat pentru a descrie orice variantă derivată dintr-o cultură celulară ce prezintă o anumită stabilitate, dar care nu poate fi de natură genetică. O altă definiție, mai acceptabilă, este aceea care descrie modificările epigenetice ca fiind schimbări veritabile în exprimarea genelor, schimbări care însă nu apar ca un rezultat al unei modificări produse în genomul celulei vegetale. În scopul clasificării unor astfel de modificări, *Stafford* (1991) a propus adoptarea unor criterii care nu pot fi luate în considerare decât sub forma unui un ghid necesar pentru interpretarea anumitor date (tabelul 12). De exemplu, anumite mutații pot să se producă la o rată mult mai mare decât cea indicată de autor, iar acestea să fie, în mod eronat, trecute în categoria modificărilor epigenetice. De asemenea, în condițiile în care nu are loc selecția, rata inducerii de variante este mult mai mică, decât cea dată în tabelul 12.

În cazul mecanismului genetic al variabilității din cadrul culturilor de țesuturi și celule vegetale, majoritatea publicațiilor apărute se referă cu precădere la nivelul ploidiei celulelor cultivate *in vitro*.

Tabelul 12. Criterii pentru clasificarea variantelor de culturi de țesuturi și celule vegetale (genetice sau epigenetice) (după *Stafford*, 1991)

Caracteristici	Genetice	Epigenetice
Inducerea variației	Mică: $10^{-5} - 10^{-7}$ per generație celulară	Mare: > 10^{-3} per generație
Natura modificării, ca răspuns la inducere	Întâmplătoare	Direcționată
Stabilitatea modificării la descendenții somatici	Stabilă în mod normal	Stabilă, dar reversibilitatea se poate produce la o rată mare
Transmiterea modificării la descendenții meiotici	Da	Nu

Poliploidia se produce în mod natural *in vivo* destul de frecvent, în special în rândul angiospermelor. Între mecanismele producerii celulelor poliploide *in vivo* și cele ale producerii celulelor poliploide *in vitro* există numeroase și substanțiale diferențe. Cauzele care conduc la apariția fenomenului de ploidie, în culturile de țesuturi și celule vegetale, au fost tratate în subcapitolul 5.4.5.2.1.

Multe dintre studiile efectuate asupra variației nivelului de ploidie s-au bazat pe observațiile efectuate asupra țesuturilor calusale și a liniilor celulare care nu erau încă pe deplin stabilizate. În acest context, trebuie subliniat faptul că, suspensiile celulare care au atins un nivel mărit și rapid al ratei de creștere, prezintă și un nivel al ploidiei stabil și relativ uniform. După *Gamborg* și *Shyluk* (1981), se pare că nu există asemenea condiții care să asigure celulelelor cultivate *in vitro* un nivel de ploidie identic cu cel al țesuturilor plantelor din care au provenit. În acest sens, autorii au prezentat (după *Evans* și *Gamborg*, 1981) o serie de date care reprezintă câteva exemple privind nivelul de ploidie al unor specii de plante și al culturilor celulare induse din ele (tabelul 13).

Tabelul 13. Numărul de cromozomi al culturilor celulare şi al speciilor de plante din care au fost induse culturile (după *Gamborg* şi *Shyluk*, 1981)

Specia	Linia celulară	Numărul de cromozomi		
		Ţesutul plantei		Cultura celulară
Glycine max	SB-64	2n = 48		37
Nicotiana glauca	NG-478	2n = 24		24
Nicotiana tabacum	SU-677	2n = 48		48
Nicotiana tabacum	NT-775	2n = 48		76
Solanum chacoence	SOC-1175	2n = 25		36
Triticum monococcum	WTM-1066	2n = 14		24
Lycopersicon esculentum	TS-675	2n = 24		104
Zea mays	BM-477	2n = 20		44
Sorghum bicolor	GPR-168	2n = 20		66
Brassica napus	RZ-573	2n = 38		40-44
Datura innoxia	DI-76	n = 12	60%	12
			37%	24

5.4.6. Metode de evaluare a creşterii culturilor de celule

5.4.6.1. Determinarea cantitativă a creşterii celulare

Succesul măsurătorilor va depinde de anumite caracteristici ale suspensiilor celulare vegetale, aşa cum este numărul şi mărimea agregatelor celulare care intră în alcătuirea lor. Pentru determinarea creşterii culturilor de celule pot fi utilizate următoarele tehnici:

A. greutatea umedă (proaspătă) şi uscată
B. numărul de celule
C. viabilitatea celulară
D. volumul sedimentului celular (VSC)
E. conţinutul celulelor în proteine, şi acizi nucleici (ADN şi ARN)
F. indexul mitotic
G. dozarea componentelor mediului
H. conductibilitatea mediului

Aceste tehnici au fost descrise într-o serie de publicaţii (*Street*, 1977; *Dixon*, 1985; *Allan*, 1991 etc.) şi sunt utilizate de către majoritatea laboratoarelor de culturi de ţesuturi şi celule vegetale.

A. Greutatea proaspătă şi uscată

Parametrul cel mai comun utilizat pentru măsurarea creşterii suspensiilor celulare este cel al determinării cantităţii de biomasă celulară care se acumulează pe parcursul unui ciclu de creştere. Aceasta poate fi măsurată direct, prin estimarea greutăţii substanţei proaspete şi uscate, sau prin metode indirecte, adesea nedistructive, care oferă anumite avantaje, în special în sistemele de cultivare masivă a celulelor.

Greutatea *substanţei proaspete* şi a celei *uscate* se determină prin trecerea suspensiilor celulare prin hârtii de filtru, aşezate pe unităţi filtrante alcătuite din site de oţel inoxidabil, plasate în pâlnii *Buchner*. Greutatea uscată a hârtiilor de filtru este măsurată după menţinerea lor la o temperatură de 60°C, timp de cca 18 ore. Greutatea *umedă* a acestora este determinată prin plasarea hârtiilor de filtru uscate, în unităţile filtrante. După umezire, se îndepărtează excesul de apă şi se recântăresc. Înainte de filtrare, se măsoară volumul suspensiei celulare folosită ca probă. Celulele se spală cu apă distilată şi, apoi, se recântăresc împreună cu hârtia de filtru pentru a determina greutatea substanţei proaspete (exprimată în mg celule/ml mediu).

Determinarea greutăţii *substanţei uscate* (exprimată în mg/ml sau g/l) se realizează prin uscarea biomasei celulare (plus filtru), la 60°C, până ce greutatea probei ajunge la o valoare constantă. În mod curent, sunt suficiente trei astfel de măsurători pentru fiecare estimare, care se exprimă ca medie a celor trei măsurători ± eroarea standard. Recoltarea probelor, la un interval de trei zile, este suficientă pentru obţinerea unei curbe de creştere, în cazul unei culturi de suspensii celulare vegetale, tipice. Totuşi, astfel de probe trebuie prelevate mai des, în special în faza exponenţială de creştere. Probele de mediu trebuie păstrate la 0°C, pentru a fi analizate modificările care au loc în alcătuirea componentelor mediului nutritiv, pe perioada ciclului de creştere. Greutatea substanţei proaspete este destul de dificil de utilizat pentru cuantificarea creşterii celulare, deoarece în cazul filtrării trebuie menţinuţi în permanenţă şi la acelaşi nivel, anumiţi parametri ca: presiunea de sucţiune şi durata sucţiunii. De asemenea, chiar şi folosirea greutăţii substanţei uscate poate să conducă la interpretarea greşită a rezultatelor, din cauza acumulării în interiorul celulelor a produşilor de stocare şi a formării polizaharidelor extracelulare.

Exprimarea matematică a *ratei de creştere* a culturilor celulare este importantă atunci când se lucrează cu populaţii celulare care se modifică pe durata cultivării acestora, aşa cum sunt cele din cultura de tip "batch" (cultură crescută într-un volum de mediu limitat şi închis, cu excepţia schimburilor gazoase). Celulele plantelor crescute *in vitro*, în sistemul

"batch", parcurg – pe perioada ciclului lor de creştere – patru faze importante, şi anume: *faza de lag* (întârziere), *faza exponenţială*, *faza staţionară* şi *faza de declin*. Aceste faze reflectă modificarea continuă a mediului lor înconjurător (mediul nutritiv), mediu din care celulele absorb nutrienţii necesari pentru prepararea metaboliţilor proprii. Rata de creştere a celulelor plantelor este, în anumite condiţii, proporţională cu concentraţia numărului de celule deja prezente. În condiţii ideale, biomasa celulară creşte într-o proporţie exponenţială:

$$N_o \rightarrow 2N_o \rightarrow 4N_o \rightarrow 8N_o \rightarrow nN_o$$

unde N_o este fie greutatea proaspătă ori cea uscată, fie numărul de celule aflate la timpul 0 ($t = 0$). Pentru a facilita explicaţia, se consideră N ca fiind numărul de celule. În condiţii ideale, atunci când creşterea exponenţială are loc, rata creşterii numărului de celule este constantă, iar intervalul de timp luat în calcul este cel necesar pentru dublarea populaţiei de celule. Acest ultim interval este denumit *timp de dublare* (t_d) al culturii şi, în această situaţie, el este echivalent cu timpul mediu de generaţie (TMG). TMG este perioada medie necesară pentru un ciclu complet de diviziune a celulelor.

Numărul de dublare n, după timpul t, este dat în formula:

$$n = \frac{t}{t_d}$$

În continuare, numărul de celule, după timpul t, va fi raportat la numărul de celule prezente iniţial (N_o) şi de aceea:

$$N_t = N_0 2^n = \frac{N_0 2^t}{t_d}$$

Rearanjând ecuaţia de mai sus, prin incorporarea logaritmilor naturali şi deoarece logaritmul natural a lui 2 este 0,693, ea se prezintă astfel:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t} = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0{,}693}{t_d} \qquad (1)$$

Graficul log N, în raport cu timpul, va fi reprezentat – în faza de creştere exponenţială – de o linie dreaptă. Gradientul acestei linii este descris de ecuaţia (1) şi se numeşte *rata specifică de creştere* (μ). Pe durata de timp corespunzătoare creşterii exponenţiale $\mu = 0{,}693/t_d$.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru determinarea creşterii unei suspensii celulare *rata specifică de creştere* mai poate fi calculată după următoarea formulă: $\mu = 1/T_2\text{-}T_1 \times \ln S_2/S_1$, unde T_1 şi T_2 reprezintă momentele recoltării celor două probe (ziua de cultură), iar S_1 şi S_2 biomasa celulară recoltată la în T_1 şi respectiv T_2. De asemenea, se mai poat calcula: *timpul de dublare a populaţiilor*, care reprezintă intervalul de timp determinat pe durata fazei exponenţiale în care – de exemplu – un număr de 1×10^6 celule creşte la 2×10^6 celule; *nivelul de dublare a populaţiilor* = $\log_{10}(N/N_o) \times 3{,}33$ (unde N = numărul de celule din vasul de cultură, la sfârşitul perioadei de creştere, iar N_o = numărul de celule inoculate în vasul de cultură); precum şi *timpul generaţiei celulare* care reprezintă intervalul dintre două diviziuni succesive.

În cazul în care se evaluează producţia compuşilor secundari de metabolism sau a enzimelor, de către suspensiile celulare vegetale, o importanţă majoră o are estimarea atât a maximului de biomasă celulară acumulată într-o cultură, cât şi a ratei specifice de creştere. Biomasa celulară maximă, care se exprimă prin greutatea substanţei uscate, poate fi identificată din reprezentarea grafică (la scară aritmetică sau semilogaritmică), reprezentare obţinută în urma prelevării frecvente de probe din cultură, înainte şi după începutul fazei staţionare de evoluţie a culturilor. În ceea ce priveşte estimarea ratei specifice de creştere, una dintre dificultăţile care apar în mod curent se datorează, în principal agregării celulelor. Din acest motiv, unii cercetători calculează rata specifică a creşterii între două sau trei puncte ale ciclului de creştere al culturilor, puncte care cuprind perioada în care creşterea celulară este cea mai intensă. În urma unui astfel de calcul rezultă o rată de creştere foarte mare, ceea ce nu este un fapt real. În locul acestui mod de abordare, rata de creştere se poate calcula între o serie de puncte, unde *N* (de exemplu substanţa uscată) începe să crească şi, apoi, să descrească. Şi în acest caz, este preferabil ca probele să fie prelevate mai des (la un interval de 24 de ore), în faza de creştere a culturii.

O metodă auxiliară de determinare a concentraţiei de biomasă constă în măsurarea turbidităţii culturii, utilizând fie spectrofotometria, fie nefelometria. Mărimea agregatelor din culturile de suspensii celulare face însă ca această tehnică să fie irelevantă şi în consecinţă, inadecvată. O metodă indirectă, mult mai puţin folosită, este aceea a măsurării balanţei de oxigen.

Determinarea numărului de celule şi a volumului sedimentului celular sunt alte două metode ce vor fi descrise în continuare.

B. Numărul de celule

Creşterea poate fi calculată şi prin determinarea numărului de celule, per volum de mediu. Numărul de celule dintr-o suspensie celulară foarte fină, poate fi determinat direct, cu ajutorul microscopului, utilizând un hemocitometru *Neubauer* (camera *Thomas* este inadecvată pentru acest scop, deoarece este mult prea mică pentru celulele plantelor). Totuşi, astfel de suspensii celulare sunt foarte rare, majoritatea lor având în componenţă agregate de diferite mărimi, grupări care vor trebui dezagregate, pentru a se reuşi numărarea celulelor.

Desfacerea (dezmembrarea) agregatelor celulare se poate realiza prin adăugarea unui volum din astfel de componente, la două volume de trioxid de crom (în concentraţie de 8%). Probele pot fi păstrate la congelator, timp de una până la şase săptămâni. Ele pot fi manipulate mai rapid prin încălzire la 70°C, pentru două sau cinci minute, după care probele vor fi răcite. În continuare, probele vor fi amestecate şi diluate cu volume cunoscute de apă, folosind pipete bine calibrate. Pentru a asigura separarea celulelor, suspensia va fi absorbită într-o seringă de plastic cu ac şi, apoi, aceasta va fi expulzată. Volumele cunoscute (de exemplu 10 µl) de suspensie bine mixată vor putea fi examinate la microscop, pentru a se determina numărul de celule. Este bine ca diluţiile folosite să conducă la o concentraţie de cca 200 de celule per 10 µl de suspensie (cca o picătură). Deoarece celulele vegetale aderă la pereţii de sticlă, este preferabil ca – în astfel de operaţiuni – să utilizeze vase de plastic sau vase de sticlă siliconizată.

O altă tehnică de dezagregare a maselor celulare constă în utilizarea unei soluţii de pectinază în concentraţie de 0,2%. Avantajul trioxidului de crom, faţă de pectinază, constă în faptul că atât el, cât şi probele tratate cu acesta pot fi stocate la temperaturi scăzute, pentru perioade îndelungate de timp. Există şi aparate automate de determinare a numărului de celule (de exemplu contorul Coulter), dar utilizarea lor este destul de limitată, mai ales în cazul culturilor celulare vegetale în care celulele, după diviziune, nu se separă unele de altele.

C. Viabilitatea celulară

O măsurare precisă a viabilităţii celulare poate fi realizată utilizând mai multe metode, prin care să se măsoare diferiţi indici fiziologici, de exemplu: a) activitatea esterazică, în cazul metodei cu acetat de fluoresceină; sau b) eficienţa respiratorie, în cazul metodei cu săruri de tetrazoliu (clorură de 2, 3 ,5, trifeniltetrazoliu – CTT).

Prezența membranei citoplasmatice semipermeabile permite celulelor vegetale vii să poată fi identificate, după capacitatea lor fie de a permite, fie de a opri, absorbția anumitor coloranți. Astfel, în urma hidrolizei enzimatice a substratului fluorescent (diacetatul de fluoresceină) are loc acumularea fluoresceinei de către celulele vii, pe când, în urma tratamentului cu albastru de *Evans* (0,025%) se colorează celulele moarte. Diacetatul de fluoresceină (DAF) poate fi preparat ca și soluție stoc (5 mg de DAF se dizolvă într-un ml de acetonă) și păstrat la 0 – 4°C, timp de mai multe luni. Lucrându-se cu soluții apoase (0,1 µl/ml), el poate fi utilizat pentru colorarea directă a celulelor, celule care, după colorare – timp de 2 minute – în soluția de DAF, vor fi observate la microscop, în lumină fluorescentă. Celulele vii, trecute într-o picătură de apă sau rămase în DAF, prezintă – în lumina ultravioletă (360 nm) – o fluorescență verzuie, luminoasă, pe când celulele moarte nu etalează nici o fluorescență. Viabilitatea celulelor poate fi exprimată procentual, față de totalul celulelor examinate. De asemenea, viabilitatea poate fi determinată calitativ prin examinarea microscopică a integrității membranei celulare, a nucleului sau prin urmărirea dinezei (curenților protoplasmatici).

Metoda determinării viabilității celulare, prin colorarea cu CTT, a fost descrisă pe larg în volumul editat de *Cachiță* (1984) și, de aceea, considerăm că nu este necesară reluarea acestui subiect.

O altă metodă care poate fi utilizată pentru măsurarea viabilității celulare a fost pusă la punct de către *Suzuki* și colaboratorii (1987). Ea constă din captarea electronilor din sistemul de transport al electronilor, existent în celulele de *Coptis japonica*, într-un sistem de acceptori artificiali. Culoarea acceptorului redus a fost monitorizată cu un spectrofotometru cu fibre optice, ca și lumină reflectată, de suprafață. Viabilitatea celulară este dată de creșterea cantitatății luminii reflectate, per unitate de timp, fiind o reprezentare a activității de transport a electronilor.

D. Volumul sedimentului celular (VSC)

Prin această metodă se poate determina, în orice moment, volumul total al celulelor prezente în cadrul unui ciclu de creștere al unei suspensii celulare. Aceasta este o metodă mult mai simplă decât cele descrise anterior, ea necesită o durată scurtă de timp și poate fi aplicată la toate tipurile de culturi de suspensii celulare, fie ele foarte fine, fie având în componența lor și agregate celulare de diferite mărimi. După calcularea VSC-ului, aceleași celule pot fi utilizate pentru măsurarea greutății umede și a celei uscate, sau pentru determinarea numărului de celule. Metoda constă în prelevarea de

eşantioane mici (cca 10 ml) din suspensia celulară, probe care vor fi apoi centrifugate, introduse fiind în tuburi conice, gradate. VSC va fi evaluat după centrifugarea probelor, la cca 500 gauşi, timp de 5 min, şi el se exprimă ca procent din volumul total al tubului de centrifugă.

E. Conţinutul celulelor în proteine şi în acizi nucleici (ADN şi ARN)

Conţinutul în proteine, în ADN şi în ARN al celulelor vegetale cultivate sub formă de suspensii, poate fi utilizat ca parametru în estimarea creşterii celulare.

Pentru a evalua conţinutul în proteine totale, celulele dintr-o suspensie se colectează prin filtrare şi se spală de două ori cu o soluţie apoasă, fierbinte, de etanol 70%. Apoi, materialul vegetal colectat se usucă cu acetonă, iar filtratul se transferă într-o soluţie de NaOH 1M şi se încălzeşte la 85°C, timp de 1,5 ore. Soluţia se filtrează şi din filtrat se determină proteinele hidrolizate prin metoda lui *Lovry* şi colab. (1951).

În literatura de specialitate sunt descrise o mare varietate de metode care se utilizează pentru determinarea conţinutului în ARN şi în ADN, la plante. Una dintre aceste metode, probabil mai simpă şi mai accesibilă, a fost descrisă pe larg de către *Dixon* (1985). Pentru analize, autorul recomandă prelevarea din cultură, a unei cantităţi iniţiale de biomasă celulară, care va fi uscată, iar cantitatea utilizată este de 250 mg. În scopul determinării acizilor nucleici, trebuie să fie parcurse o serie de etape, care privesc omogenizarea celulelor în metanol, centrifugarea şi filtrarea omogenatului, din reziduul rezultat urmând a fi extraşi, în continuare, succesiv, acizii nucleici, prin administrarea mai multor compuşi, cum sunt: acidul tricloracetic, etanolul, acetatul de sodiu anhidru, amestecul de etanol:cloroform şi etanol:eter, soluţia de KOH etc. După această serie de tratamente, care sunt intercalate cu spălări şi stocări ale reziduului la anumite temperaturi, supernatantul rezultat din ultima etapă de extracţie, reprezintă fracţiunea crudă de ARN, care, după purificare, poate fi determinat spectrofotometric la 260 nm. Pentru determinarea ADN-ului, precipitatul rămas trebuie tratat de trei ori, cu 5 ml acid percloric 0,5 M, la 70°C, timp de 20 min. Conţinutul de ADN, din extractul de acid percloric, se poate determina utilizând metoda cu difenilamină a lui *Burton* (1955).

F. Indexul mitotic

Diviziunea celulelor face parte integrantă din creştere. La eucariote există două tipuri de diviziuni celulare: *mitoza* şi *meioza*. Mitoza sau diviziunea normală, tipică, se caracterizează prin următoarele faze sau etape: profaza, metafaza, anafaza şi telofaza, etape care privesc diviziunea nucle-

ului, ce este urmată de citodiereză. Meioza este un tip de diviziune celulară atipică sau reducțională, ce are loc în celulele mame ale grăuncioarelor de polen din antere și în sacul embrionar al ovulelor. Din punctul de vedere al culturilor vegetale *in vitro*, acest tip de diviziune celulară este utilizat în scopul obținerii de plante haploide.

Indexul mitotic este o metodă de estimare a numărului de celule dintr-o populație, celule care se găsesc, la un moment dat, în mitoză. Determinarea indexului mitotic este simplă, dar necesită un timp mai îndelungat pentru prelevarea de probe și examinarea acestora la microscop.

Mitoza se distinge ușor de interfază (moment în care cromatina din nucleul celulelor este difuză), deoarece în fazele mitozei cromozomii apar individualizați. Evidențierea cromozomilor se realizează cu ajutorul coloranților specifici pentru ADN, de exemplu cu colorantul diamidino-2-fenilindol (DAPI), care se leagă specific de ADN (în același scop, mai pot fi folosiți coloranți ca: reactivul Feulgen sau albastru de toluidină). Pentru aceasta, celulele prelevate din culturile de suspensii se spală cu apă distilată și, apoi, se fixează timp de 1 oră (la temperatura camerei), cu un amestec format din 2 volume etanol absolut, la 1 volum de acid acetic glacial. Fixativul este îndepărtat prin centrifugare, după care se trece la spălarea celulelor cu apă distilată. În continuare, celulele sunt colorate cu DAPI, în concentrație de 0,5 µg/ml (colorantul sub formă de soluție se poate păstra în frigider, la 0 - 4°C). După parcurgerea acestei etape, celulele sunt așezate într-o picătură de colorant, pe o lamă de microscop (pe care s-a întins – în prealabil – un strat fin de albumină glicerinată), peste ele plasându-se o lamelă, iar deasupra o bucată de hârtie de filtru. Prin presare (strivire) este îndepărtat excesul de colorant, iar celulele se etalează pe lama de microscopie, într-un strat uniform și subțire. Observațiile efectuate la microscopul cu lumină fluorescentă (filtru = 400 nm) scot în evidență nucleii și cromozomii colorați în albastru luminos. Pentru a se efectua calculul, trebuie examinați un număr de cca 1000 de nuclei:

$$\text{Index mitotic} = \frac{\text{Nr. de nuclei în mitoză}}{\text{Nr. total de nuclei numărați}} \times 100$$

Indexul mitotic este direct proporțional cu durata mitozei/media duratei ciclului celular, considerând că toate celulele din cultură trec prin ciclul celular. În culturile celulare vegetale durata mitozei este, în mod obișnuit, relativ mai scurtă decât durata totală a ciclului celular (< 10%).

G. Dozarea componentelor mediului

Epuizarea unor componente din mediul de cultură, cum sunt: zaharoza sau glucoza, azotatul şi fosfatul, constituie un reper ce poate fi utilizat pentru estimarea creşterii celulelor aflate în cultură. În acest scop, din mediu se colectează probe prin filtrarea suspensiilor celulare, filtrare care se efectuează periodic, aşa cum am mai relatat, pentru colectarea biomasei celulare, în scopul determinării creşterii culturilor de celule. Probele astfel obţinute pot fi păstrate un timp la congelator, ulterior fiind analizate din punctul de vedere al conţinutului lor în nutrienţii amintiţi.

H. Conductibilitatea mediului

Păstrarea integrităţii membranelor plasmatice ale celulelor vegetale este reflectată de concentraţia soluţiilor care sunt excretate sau eliminate în mediu, ori sunt absorbite sau resorbite de către celule din mediul în care ele trăiesc. Astfel, în cazul suspensiilor celulare vegetale, conductibilitatea electrică a mediului de cultură poate fi utilizată pentru evaluarea dinamicii creşterii celulare. În acest sens, s-a găsit că există o corelaţie inversă între conductibilitatea electrică a mediului de cultură şi creşterea celulară. De exemplu, în culturile celulare de *Pyrus communis*, *Ryu* şi colaboratorii (1990) au demonstrat existenţa unei corelaţii lineare, directe, între descreşterea conductibilităţii mediului de cultură şi mărirea cantităţii de biomasă celulară, uscată. Rezultatele sugerează faptul că rata absorbţiei ionilor poate fi corelată cu rata creşterii culturilor celulare. Mai mulţi autori, citaţi de *Ryu* şi colab. (1990), au ajuns la concluzia că metoda conductibilităţii poate fi utilizată pentru determinarea cantitativă a influxului şi efluxului de electroliţi, care traversează plasmalema celulelei vegetale. De asemena, s-a remarcat faptul că, această conductibilitate a mediului de cultură este direct proporţională cu concentraţia unor ioni aflaţi în mediu, aşa cum sunt cei de amoniu sau de azotat. Din datele culese din literatura de specialitate, reiese clar că schimbarea conductibilităţii electrice a mediului este datorată modificărilor care se produc în mediu de cultură, în ceea ce priveşte concentraţia unor ioni anorganici, aşa cum sunt cei de amoniu, de azotat, de fosfat ş.a.m.d.

5.4.7. Factorii care influenţează creşterea culturilor de calus şi a celor de suspensii celulare

5.4.7.1. Presiunea osmotică a mediului nutritiv.

Posibilitatea ca mediul de cultură să influenţeze celulele vegetale cultivate *in vitro*, datorită modificării concentraţiei compuşilor prezenţi în

acesta, sau a naturii componentelor sale, a fost studiată cu mult timp în urmă de către mai mulți cercetători (*Maretzki* și colab., 1972; *Towill* și *Mazur*,1976). În experimentele efectuate cu suspensii celulare de trestie de zahă, *Maretzki* și colab., (1972) au introdus în mediul de cultură anumiți agenți osmotic activi ca: manitolul, Carbovax 1000 sau NaCl. În urma unei astfel de suplimentări, autorii citați au observat apariția unor modificări atât în creșterea celulelor, cât și în metabolismul lor. Investigații similare au fost efectuate de către *Withers* și *Street* (1977), cu suspensii celulare de *Acer pseudoplatanus* și *Capsicum annuum*. Ei au remarcat faptul că, în prezența manitolului, volumul celulelor scade, dar se mărește rezistența acestora la temperaturi scăzute. În acest sens, se cunoaște faptul că mediile nutritive, originale, sunt alcătuite din substanțe organice și anorganice, aflate în anumite concentrații, care conferă mediului o presiune osmotică apropiată de aceea existentă în interiorul celulelor vegetale, respectiv mediul de cultură este izotonic cu mediul endocelular. Printr-o mărire a presiunii osmotice a mediului de cultură, ce poate fi indusă fie prin creșterea concentrației unor substanțe care intră permanent în alcătuirea mediilor de cultură (de exemplu zaharoza), fie prin adăugarea unor compuși osmotic activi, are loc un proces de exosmoză, mai mult sau mai puțin accentuat. Deci, ca urmare a exosmozei, este normal ca volumul celulelor să se micșoreze, cum normală este și creșterea rezistenței acestora la frig, având în vedere faptul că celula pierde, prin procesul de exosmoză, o anumită cantitate de apă.

Unii autori (*Kimball* și colab.,1975) au constatat că introducerea manitolului sau a sorbitolului în mediul de cultură al calusurilor de soia a avut ca efect creșterea biomasei proaspete și uscate a acestora. Totuși, rezultatele obținute de noi cu suspensii celulare de *Digitalis lanata* (*Deliu* și colab., 2001 a, lucrare în curs de apariție), sunt în contradicție cu cele ale autorilor citați mai sus. Astfel, adăugarea în mediul de cultură al suspensiilor celulare de *D. lanata* a compușilor amintiți (manitolul sau sorbitolul), a avut ca efect inhibiția creșterii biomasei celulare proaspete (sau umedă). Diferențele înregistrate între cele două experimente au o anumită explicație, astfel: a) în primul rând, în experimentele citate au fost utilizate specii diferite; b) în al doilea rând, culturile calusale de *Glycine max* au fost menținute pe mediile nutritive o perioadă mult mai îndelungată de timp, în comparație cu durata de cultură a suspensiilor celulare de *D. lanata*. În acest mod, în cazul țesuturilor calusale de soia, există posibilitatea ca ele să-și revină spre sfârșitul perioadei de cultură din șocul osmotic produs de manitol, având în vedere că plasmalema este o biomembrană care prezintă o semipermeabilitate selectivă și relativă.

5.4.7.2. Nutrienții

Pentru a înțelege cât mai bine modul de nutriție, precum și rolul nutrienților în procesele de creștere, respectiv de dezvoltare a plantelor superioare, fie că sunt intacte, fie că sunt sub forma de culturi de țesuturi și celule, sunt necesare studii foarte complexe. Acestea, trebuie să vizeze aspecte multiple cu privire la ansamblul proceselor metabolice, la enzimele implicate în căile de sinteză și de degradare a produșilor metabolici, precum și aspecte de genetică moleculară. În acest subcapitol ne vom ocupa însă, cu precădere, de rolul pe care îl au anumite substanțe nutritive în creșterea culturilor de suspensii celulare vegetale, sau a celor calusale.

Pentru dezvoltarea cormofitelor, care cresc în cadrul natural, sunt necesare trei categorii mari de nutrienți. Astfel, nutrienții anorganici sunt obținuți de plante împreună cu apa, în general, prin sistemul lor radicular. Dioxidul de carbon din atmosferă este utilizat în procesul de fotosinteză pentru formarea hidraților de carbon, compuși care constituie principala sursă de energie. În fine, planta intactă sintetizează toate vitaminele și substanțele de creștere care îi sunt esențiale pentru o creștere normală, în cadrul habitatului în care ea se dezvoltă.

Necesarul plantelor cultivate *in vitro* pentru nutrienți este, în general, asemănător cu cel al plantelor intacte. Totuși, în marea majoritate a cazurilor, *in vitro* sunt inoculate și cultivate doar țesuturi izolate din plante, sau organe ale acestora. Aceste țesuturi sau organe izolate sunt incapabile să sintetizeze compușii lor proprii, așa cum sunt hidrații de carbon, vitaminele sau fitohormonii. Din acest motiv, asemenea substanțe organice, alături de sărurile minerale, trebuie să parvină celulelor vegetale cultivate *in vitro*, în mod artificial, prin introducerea lor în mediile nutritive pe care, sau în care, sunt cultivate explantele prelevate din plantele intacte.

Succesul în creșterea celulelor vegetale *in vitro* este determinat, în general, de natura explantului și de compoziția mediului nutritiv (*White*, 1951). În primele încercări de a cultiva *in vitro* țesuturi și organe prelevate din cormofite (efectuate în jurul anului 1940) s-au utilizat ca medii nutritive soluții minerale simple, ca cele ale lui *Knop* (1865), precum și cele ale lui *Hoagland* și *Arnon* (1938). De atunci, au fost preparate și testate foarte multe variante de medii nutritive, dintre care, medii ca: mediul *White* (1943 și 1963) - utilizat cu precădere pentru cultivarea *in vitro* a rădăcinilor excizate, mediul *Nitsch* (1951) - destinat cultivării *in vitro* a ovarelor, sau cel a lui *Nitsch* și *Nitsch* (1969) - elaborat pentru obținerea culturilor haploide, sunt considerate și astăzi a fi cele mai bune. Multe alte medii, apărute în

ultimul timp în literatura de specialitate, nu sunt altceva decât rețete modificate ale mediilor nutritive elaborate de către *White* (1943 şi 1963); *Gautheret* (1959 şi 1977); *Heller* (1953); *Murashige* şi *Skoog* (1962) şi *Gamborg* şi colab. (1968). Este regretabil faptul că, de foarte multe ori, s-a constatat tendința de a se da noi nume acestor medii de cultură, producându-se astfel numeroase confuzii.

Principalele grupe de compuşi chimici care intră în alcătuirea mediilor de cultură, şi de care ne vom ocupa în acest subcapitol, sunt nutrienții *anorganici* şi *organici*.

5.4.7.2.1. *Nutrienții anorganici.*

Aceleaşi *elemente* esențiale utilizate de plantele intacte, sunt necesare şi indispensabile pentru dezvoltarea normală a țesuturilor şi celulelor vegetale cultivate *in vitro*. Ele intră în componența mai multor nutrienții minerali, sau anorganici, fiind clasificate după mai multe criterii. Astfel, *Clarkson* şi *Hanson* (1980) le-au împărțit în două grupe mari: a) elemente legate covalent de compuşii carbonului, elemente care sunt constituente vitale ale macromoleculelor de ADN, ARN şi proteine – N, P, S; b) alte elemente ce participă într-o serie de procese, procese care adeseori interferează (reglarea osmotică şi gradienții electrici, sau conformația proteinelor şi reacțiile de oxido-reducere a metalo-proteinelor) – K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, B, I, Cl etc.

Un alt tip de clasificare, ales destul de arbitrar (dar care apare menționat în majoritatea publicațiilor), este acela în care elementele sunt grupate după cantitatea în care ele intră în alcătuirea mediilor nutritive: a) *macroelemente* – N, P, S, K, Mg, Ca, Na, Cl; b) *microelemente*: Fe, Zn, Mn, I, B, Mo, Co, Cu.

A. Macroelementele. Unul dintre principalele elemente care intră în alcătuirea tuturor mediilor nutrititive este *azotul*. Probabil că, *forma* sub care este utilizat azotul (oxidată sau redusă, organică sau anorganică) este responsabilă pentru cele mai pronunțate efecte cu privire la multiplicarea, creşterea şi diferențierea celulelor vegetale cultivate *in vitro*. În general, azotul este adăugat în mediile de cultură sub forma de NH_4^+, alături de NO_3^-. În majoritatea cazurilor, prezența ionului de amoniu ca şi unică sursă de azot, este improprie asigurării unei mai bune evoluții a culturilor, deoarece, probabil, în astfel de situații, pH-ul mediului are tendința de a scădea la valori de sub 5, pe durata perioadei de cultivare. Această scădere a pH-ului poate să conducă la reducerea accesibilității azotului pentru celule, fenome-

nul fiind demonstrat la mai multe specii cultivate *in vitro*, sub formă de suspensii celulare, aşa cum au fost cele de soia (*Gamborg* şi colab., 1968), de orez (*Ohira* şi colab., 1973) sau de morcov (*Wetherell* şi *Dougall*, 1976).

Suplimentarea mediului de cultură cu KNO_3, în concentraţii cuprinse între 20 şi 40 mM, poate preveni fluctuaţiile extreme ale pH-lui. Totuşi, NH_4^+ poate fi utilizat ca unică sursă de azot atunci când în mediu se mai adaugă săruri ale unor acizi organici, cum sunt: malatul, succinatul, citratul sau fumaratul (*Gamborg* şi *Shyluk*, 1970). Rolul pe care îl îndeplinesc aceşti acizi organici în astfel de situaţii nu a fost încă elucidat. Cu toate că ionul de amoniu se întrebuinţează extrem de rar ca unică sursă de azot, suplimentarea mediilor cu cantităţi mici de NH_4^+ poate fi esenţială pentru asigurarea unei creşteri normale a celulelor şi ţesuturilor vegetale cultivate *in vitro*. Un exemplu în acest sens îl reprezintă culturile celulare de soia, la care s-a constatat că KNO_3, singur, nu susţine stisfăcător creşterea suspensiilor, dar adăugarea de NH_4^+, în concentraţia de 2 mM, a avut ca efect o mărire substanţială a creşterii (*Gamborg* şi colab., 1968, *Bayley* şi colab., 1972). Suspensiile celulare de grâu cresc la fel de bine atât în prezenţa, cât şi în absenţa ionului de amoniu (*Bayley* şi colab., 1972). În culturile celulare de grâu şi de soia, NH_4^+ a fost absorbit în mod preferenţial de către celule, el dispărând din mediu chiar din ziua a treia de cultură, moment în care utilizarea NO_3^- de către celule începe să sporească. Ionul azotat poate fi utilizat ca unică sursă de azot, atunci când mediul este suplimentat cu aminoacizi. În acest sens, *Filner* (1966), a împărţit aminoacizii în două clase, în funcţie de efectul lor asupra celulelor de tutun: a) aminoacizi ca alanina, asparagina, glicina, metionina, prolina, treonina, valina, acidul aspartic, acidul glutamic, histidina şi leucina, care inhibă atât creşterea celulară, cât şi inducerea nitratreductazei în celule şi b) aminoacizi ca arginina şi lizina care nu exercită astfel de efecte. Totuşi, *Behrend* şi *Mateles* (1975) au arătat că atunci când se adaugă câte un singur aminoacid în culturile celulare de tutun, soia sau morcov crescute în medii cu NO_3^-, ca sursă unică de azot, acesta inhibă creşterea şi inducerea nitratreductazei, dar în alt mod decât cel arătat de *Filner* (1966) la celulele de tutun.

Deşi, în mod normal, *fosforul* şi *sulful* sunt adăugaţi în mediile de cultură sub forma de fosfaţi şi respectiv de sulfaţi, se pot utiliza şi alte forme chimice anorganice sau organice ale acestor elemente. Fosfatul este constituentul de bază care tamponează mediile culturilor de ţesuturi vegetale. În acest context, mediul lui *Heller* diferă de mediul lui *White* printr-un nivel crescut de fosfor şi potasiu. *Murashige* şi *Skoog* (1968) au găsit că utilizarea unor nivele de fosfor mai mari de 2 mM pot avea un efect inhibitor asupra

creşterii ţesuturilor de tutun cultivate *in vitro*, concentraţia optimă de PO_4^{3-} fiind de 1,25 mM. Această concentraţie de 2 mM a fost doar aparent suboptimală pentru creşterea culturilor de celule de *Haplopappus gracilis*, deoarece, în urma dublării cantităţii de fosfat din mediu, s-a constatat o mărire cu 50 % a ratei de creştere a acestora (*Eriksson*, 1965). *Carew* şi *Kreuger* (1977) arătau că rata creşterii suspensiilor celulare de *Catharanthus roseus* a fost mai mare în mediile cu 2,2 mM şi cu 5,45 mM de PO_4^{3-}, decât în cele cu un aport de 1,1 mM, PO_4^{3-}, dar, când acest ion a fost prezent în mediu într-o concentraţie de 10,9 mM, rata creşterii culturilor a scăzut. *Bayliss* şi colaboratorii (1977) au constatat şi ei că, în cazul suspensiilor celulare de *Daucus carota*, creşterea este limitată de concentraţia de fosfat prezentă în mediu. De asemenea, autorii respectivi arătau că avantajul competitiv al liniilor celulare de morcov subtetraploide asupra celor diploide, aflate în cocultură cu cele subtetraploide, se datorează capacităţii lor de a-şi menţine creşterea exponenţială în medii cu concentraţii mai mici de PO_4^{3-} decât cele necesare pentru liniile diploide.

Anumiţi compuşi organici, în alcătuirea cărora intră şi *sulful*, pot fi asimilaţi de către ţesuturile vegetale cultivate *in vitro*. Astfel, *Hart* şi *Filner* (1969) au dovedit că L-*cisteina*, L-*metionina* şi *glutationul* sunt o sursă satisfăcătoare de sulf pentru culturile de ţesuturi de tutun. *Nickell* şi *Burkholder* (1950) au arătat, însă, că în cazul ţesuturilor tumorale de *Rumex*, creşterea a fost optimă numai atunci când cisteina a reprezentat singura sursă de sulf, din mediul de cultură.

Potasiul (K^+), în concentraţia de 1 mM, asigură, în mod normal, creşterea suspensiilor celulare de morcov. Totuşi, în cazul embriogenezei somatice, la *Daucus carota*, este nevoie de o cantitate mult mai mare de potasiu, şi anume, de 20 mM (*Brown* şi colab., 1976). În acest context, se consideră că există o corelaţie între ionii de potasiu şi cei de amoniu, în sensul că efectul NH_4^+ asupra embriogenezei somatice poate depinde de concentraţia de K^+ din mediul de cultură (*Tazawa* şi *Reinert*, 1969). *Ohira* şi colaboratorii (1973) au înregistrat o uşoară stimulare a creşterii suspensiilor celulare de orez (cu 30%), cultivate în medii în care concentraţia potasiului a variat de la 0, la 100 mM. În contradicţie cu rezultatele lor, măsurătorile efectuate asupra conductibilităţii electrice ale mediului şi ale nivelului azotatului în acesta, pe durata creşterii suspensiilor celulare de *Glycine* şi de *Petroselinum* (*Hahlbrock* şi colab., 1974), precum şi a celor de *Morinda citrifolia*, cultivate în medii cu KNO_3 (ca şi component ionic major), au aratat faptul că K^+ este absorbit în cantităţi foarte mari de către celulele respective.

În cazul macroelementelor *calciu* şi *magneziu*, s-a observat că există un anumit antagonism, deoarece mărirea concentraţiei unuia dintre cele două elemente atrage după sine necesitatea sporirii concentraţiei celuilalt (*Heller*, 1965; *Ohira* şi colab., 1973).

B. Microelemetele - care intră în mod obişnuit în alcătuirea mediilor de cultură, sub formă de săruri, sunt: Fe, Mn, B, Zn, Mo, Cu, I, şi Co. Lipsa unuia dintre aceste microelemente poate să conducă, uneori, la apariţia unor perturbări destul de profunde ale creşterii culturilor de suspensii celulare, vegetale. De fapt, acest fenomen este normal, având în vedere că multe dintre microelemente intră în alcătuirea moleculelor unor vitamine, ca şi cofactori, sau în alcătuirea unor sisteme enzimatice. Astfel, după *Ohira* şi colab. (1975), carenţa în Fe reduce puternic creşterea suspensiilor celulare de orez, iar lipsa microelementelor Zn, Cu, B, Mn şi Mo exercită, de asemenea, un efect inhibitor (mai pronunţat în cazul Zn şi mai puţin detectabil în cazul Mo). Totodată, autorii menţionaţi au constatat că suspensiile celulare de orez îşi încetează creşterea după al treilea transfer în mediu de cultură lipsit de Zn şi Cu, dar cresc în continuare – chiar şi după al şaselea transfer – în medii de lipsite de Mn, Mo, I şi de B. *Heller* (1953) a observat efectul inhibitor pe care îl exercită carenţa mediilor de cultură în Fe, Zn, Cu, B şi Mn (el nu a inclus în medii şi Mo), asupra creşterii ţesuturilor şi celulelor de morcov cultivate *in vitro*. *Murashige* şi *Skoog* (1962), utilizând diferite concentraţii de Mo, nu au observat nici o diferenţă în ceea ce priveşte creşterea ţesuturilor de tutun. *Molibdenul* este un component al nitratreductazei, fiind un element esenţial pentru nutriţia plantelor, astfel că că el a fost inclus, în mod frecvent, în alcătuirea mediilor de cultură. *Fierul*, al cărui accesibilitate poate fi redusă datorită precipitării sărurilor sale în urma scăderii pH-ului mediului de cultură, este adăugat în mediul nutritiv fie sub formă chelatată, fie sub forma comercială de Sequestren, sau în complex cu Na_2EDTA* (complex care poate fi preparat destul de uşor). Multe dintre medii conţin în jur de 0,1 mM Fe. *Murashige* şi *Skoog* (1962) au utilizat 27,8 mg/l de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 mM) şi 37,3 mg/l Na_2-EDTA. Din punctul de vedere al lui *Singh* şi *Krikorian* (1980) aceste cantităţi de Fe şi de EDTA nu sunt echimolare, iar excesul de EDTA poate să chelatizeze şi alte metale din mediul de cultură. Excesul de EDTA se datorează, probabil faptului că nu a fost luată în calcul forma sub care se găseşte sarea de sodiu a acestui compus, hidratată – Na_2-EDTA·$2H_2O$, sau nehidratată – Na_2-EDTA. Atunci

* Na_2EDTA – ethylendiaminotetraacetic acid disodium salt

când se utilizează forma nehidratată este necesar să se recalculeze cantitatea de Na_2-EDTA (de la 37,3 mg/l, la 33,6 mg/l).

Deşi *cuprul* a fost considerat de foarte mulţi cercetători ca fiind un microelement cu efecte nesemnificative asupra dezvoltării *in vitro* a ţesuturilor şi celulelor vegetale, *Misawa* şi colaboratorii (1975) au demonstrat că mărirea concentraţiei de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, de la 0,025 mg/l, la 0,125 mg/l, a condus la stimularea creşterii suspensiilor celulare de *Phytolacca americana*. De asemenea, a fost demonstrată şi dependenţa faţă de ionii de Cu^{2+}, în concentraţii de până la 2 mg/l, a culturilor celulare de *Acer pseudoplatanus* (*Bligny* şi *Douce*, 1977). Autorii citaţi mai sus, au găsit că absorbţia oxigenului în mitocondriile celulelor crescute în medii deficitare în Cu^{2+}, a fost foarte asemănătoare cu aceea a celulelor crescute în condiţii normale, dar celulele au fost mai sensibile la acţiunea inhibitoare a KCN. Totodată, ei au constatat că nivelul citocrom *C* oxidazei a fost mai redus în celulele crescute în absenţa cuprului. Totuşi, sporirea nivelului de sulfat de cupru în mediul de cultură al suspensiilor celulare de *Berberis parvifolia*, la valori de peste 1 mg/l, a condus la inhibarea creşterii celulare într-o proporţie de peste 20% (*Deliu* şi colab., 1994 b).

Cu toate că două dintre micoelementele enumerate, respectiv *cobaltul* şi *iodul*, s-au dovedit a fi neesenţiale în nutriţia plantelor intacte, ele au fost totuşi introduse în alcătuirea majorităţii mediilor de cultură destinate creşterii ţesuturilor şi celulelor vegetale. Astfel, *Hildebrandt* şi colaboratrii (1946) au arătat că iodul este benefic pentru creşterea rădăcinilor excizate din plantele de tomate şi de tutun, iar cobaltul a fost inclus în reţeta de medii de cultură de către *Murashige* şi *Skoog* (1962), deoarece – cu mult înainte – s-a demonstrat rolul benefic pe care îl are acesta în metabolismul plantelor.

Nici *aluminiul* şi nici *nichelul* nu sunt elemente esenţiale pentru creşterea ţesuturilor vegetale, dar ele au fost totuşi incluse de către *Heller* (1953), în compoziţia mediilor nutritive, deoarece s-a observat că el stimulează, într-o oarecare măsură, creşterea calusurilor. În privinţa nichelului, un constituient al metaloenzimei ureaza, *Eskew* şi colaboratorii (1983) au demonstrat, după riguroase purificări ale mediului nutritiv, că acesta este un element esenţial pentru cultivarea *in vitro* a plantelor de soia şi, probabil, pentru toate culturile de ţesuturi şi celule vegetale.

S-a constatat că unele microelemente, în anumite condiţii, pot să fie toxice pentru celulele vegetale cultivate *in vitro*. Astfel, în cazul în care suspensiile celulare de *Haplopappus gracilis* au fost inoculate la o densitate mică, într-un mediu ce conţinea microelemente în concentraţiile indicate de către *Murashige* şi *Skoog* (1962), acestea nu au crescut. Totuşi, s-a găsit o

creştere optimă a celulelor atunci când concentraţia respectivelor microelemente, din mediul de cultură, a fost redusă cu 10%. În aceste experimente, KI a fost omisă deoarece ea s-a dovedit a fi toxică pentru celulele de *Haplopappus* crescute la întuneric (*Eriksson*, 1965). Tot în acest sens, *Zenk* şi colab. (1975) au arătat că KI poate fi omisă din mediul de cultură al suspensiilor celulare de *Morinda citrifolia*, iar microelementele Mn, B, Zn, Mo, Cu şi Co pot şi ele să lipsească din mediu, cel puţin pe durata unui pasaj, fără ca creşterea culturilor să fie afectată. Totuşi, în acest din urmă caz, în celule s-a observat o scădere a producţiei de antrachinone.

5.4.7.2.2. *Nutrienţii organici*

Nutrienţii organici, aşa cum sunt hidraţii de carbon, reglatorii de creştere şi vitaminele, sunt compuşi necesari pentru toate tipurile de ţesuturi şi celule vegetale cultivate *in vitro*. în plus, în mediile de cultură au mai fost incluse numeroase extracte naturale complexe, endosperme lichide şi, în unele cazuri, cărbune activ.

A. Hidraţii de carbon. Capacitatea diferiţilor hidraţi de carbon de a asigura creşterea calusurilor şi a suspensiilor celulare vegetale a fost evidenţiată încă din anul 1974, de către *Maretzki* şi colaboratorii. Autorii au ajuns la concluzia, că zaharoza, sau monozaharidele care o compun, respectiv glucoza şi fructoza, ca surse de carbon, pot asigura o creştere optimă ţesuturilor vegetale cultivate *in vitro*. Ei au arătat că aceşti hidraţi de carbon pot fi substituiţi cu alţii, dar creşterea va fi diferită, în funcţie de specie sau de clonă, nu însă şi de tipul de ţesut din care au fost izolate explantele. În ceea ce priveşte concentaţiile optime de zaharoză care asigură creşterea maximă a celulelor şi ţesuturilor vegetale cultivate *in vitro*, sunt cuprinse între 2 şi 3%. Totuşi, în unele cazuri, cantităţile de glucide necesare pentru buna dezvoltare a celulelor sunt mult mai mari. Astfel, pentru culturile celulare de *Acer pseudoplatanus* (*Carceller* şi colab.,1971) concentraţia optimă de zaharoză a fost de 6%, iar pentru cele de *Populus sp.* şi de *Nicotiana glutinosa* a fost de 5% (*Matsumoto* şi colab., 1971).

Alte dizaharide care pot fi utilizate de ţesuturile vegetale cultivate *in vitro*, în funcţie de specia din care provin, sunt: maltoza, lactoza, celobioza, melibioza şi trehaloza (*Hildebrandt* şi *Riker*, 1949; *Nickell* şi *Burkholder*, 1950; *Nickell* şi *Maretzki*, 1970; *Verma* şi *Dougall*, 1977). De asemenea, trizaharide ca rafinoza, tetrazaharide ca stahioza sau polizaharidul amidon pot fi metabolizate de către anumite ţesuturi şi celule cultivate *in vitro*, cum ar fi cele de morcov, de *Rumex*, ori de trestie de zahăr (cazul amidonului).

În afară de glucoză şi de fructoză, au mai fost citate ca accesibile pentru anumite specii, clone, ori mutanţi, monozaharidele: galactoză (*Hildebrandt* şi *Riker*, 1949), manoză (*Verma* şi *Dougall*, 1977), manitolul (*Wolter* şi *Skoog*, 1966), sorbitolul (Chong şi Taper, 1974), riboza (*Nickell* şi *Maretzki*, 1970), sau glicerolul (*Grout* şi colab., 1976; *Ben-Hayyim* şi *Neumann*, 1983). S-a constatat că arabinoza, xiloza şi ramnoza nu asigură energia necesară creşterii culturilor de ţesuturi şi celule vegetale. De asemenea, s-a observat că nici pentozele, aşa cum sunt acidul uronic sau inozitolul, ca surse unice de carbon şi de energie, nu întreţin creşterea ţesuturilor şi celulelor vegetale cultivate *in vitro*.

B. Inozitolul. Deoarece mezo-inozitolul (sau myo-inositolul) este încadrat, de către unii autori, în clasa hidraţilor de carbon, iar de către alţii în categoria vitaminelor, noi l-am încadrat ca pe un compus aparte. Inozitolul este utilizat în majoritatea mediilor nutritive, în cantităţi care nu îi justifică nici denumirea de itamină şi nici cel de hidrat de carbon, deoarece concentraţia lui este, în mod frecvent, aceea de 100 mg/l. Deşi inozitolul, ca singură sursă de carbon, nu susţine creşterea ţesuturilor vegetale, totuşi există date în literatura de specialitate care atestă rolul major pe care îl joacă acest compus,în unele cazuri. Astfel, s-a dovedit că inozitolul este esenţial pentru creşterea suspensiilor celulare de *Morinda citrifolia* (*Zenk* şi colab.,1975) şi că acesta măreşte eficienţa inducerii coloniilor calusale din celulele de *Convulvulus arvensis* cultivate *in vitro*, asigurând şi creşterea ţesuturilor calusale (*Earle* şi *Torrey*, 1965).

C. Regulatorii de creştere vegetali. Se cunoaşte destul de bine influenţa pe care o au regulatorii de creştere vegetali şi în special auxinele şi citochininele, asupra celulelor vegetale, respectiv asupra procesului de elongaţie şi al celui de diviziune şi, în general, asupra metabolismului acestora. Desigur, nu trebuie uitat faptul că aceste substanţe îşi exercită influenţa asupra citoscheletului, prin intermediul microtubulilor corticali pe care îi orientează în diferite direcţii, limitând (citochininele), sau, dimpotrivă, mărind expansiunea (auxinele) celulară. Semnalul căii de transducţie, a remodelării citoscheletului de către fitohormoni, este foarte puţin cunoscut, iar lucrările cu privire la tubulină (*Schellenbaum* şi colab., 1993) şi la proteinele legate de actină, aşa cum este spectrina (*De Rujiter* şi *Emons*, 1993), nu au reuşit încă să elucideze acest fenomen. Este normal deci, ca aceşti compuşi să joace, alături de hidraţii de carbon şi de vitamine, un rol important în creşterea şi metabolismul ţesuturilor şi celulelor vegetale cultivate *in vitro*, introducerea lor în mediul de cultură fiind necesară, în majoritatea cazurilor. Totuşi, după cum s-a mai amintit, există ţesuturi sau celule vegetale care sunt capabile să-

şi sintetizeze cantităţi suficiente de hormoni, care să le asigure creşterea. În acest din urmă caz, este vorba de culturile de ţesuturi şi celule vegetale *habituate*. Una dintre lucrările clasice care se referă la creşterea şi morfogeneza explantelor cultivate *in vitro*, procese controlate de raportul dintre auxine/citochinine, este aceea a lui *Skoog* şi *Miller* (1957). Ei au arătat că, prin modificarea concentraţiei celor două categorii de hormoni vegetali, se poate obţine fie creşterea neorganizată a calusurilor de tutun, fie creşterea acestora cu formarea de tulpini sau de rădăcini, în funcţie de regulatorul de creştere care predomina în mediul de cultură.

În cazul culturilor de calusuri sau de suspensii celulare se utilizează, în general, aceiaşi hormoni vegetali, naturali (fitohormoni) ori sintetici (fitoregulatori sau regulatori de creştere vegetali), care sunt comuni pentru toate culturile de ţesuturi vegetale. Citochinine, ca benzilaminopurina (BA – benzilaminopurina, sinonimă cu BA - benziladenina), chinetina (K sau Kin), N^6 - (δ^2-izopentenil) adenina (2iP) sau zeatina (Z), pot intra în alcătuirea mediilor nutritive ale culturilor de suspensii celulare, dar există posibilitatea ca aceste celule să crească şi în absenţa lor. Concentraţiile în care se utilizează citochinele în mediile de cultură depind de natura acestor compuşi, de specie şi de scopul urmărit. Astfel, în cazul calusului de tutun, concentraţiile de 2iP, necesare pentru creşterea maximă a acestora, pot varia de la 3×10^{-9}, la 3×10^{-5} M, iar cele de K sau de BA de la 3×10^{-7}, la 10^{-6} M. Zeatina pare să fie mai activă în concentraţii mai mici, în comparaţie cu cele de 2iP (*Skoog* şi colab., 1967). Totuşi, alţi autori au găsit că în culturile de hipocotil de bumbac, chinetina, în concetraţia de 1 mg/l, a fost mai eficientă în ceea ce priveşte iniţierea de calus, dar pentru subcultivarea lui s-a preferat BA (0,5 – 1 mg/l), ori 2iP (5-10 mg/l) (*Price* şi colab., 1977).

Necesarul de citochinine al unor linii celulare poate fi diferit, în funcţie de anumite condiţii sau de anumite tratamente. În acest sens, *Syono* şi *Furuya* (1971) au arătat că o sublinie celulară de tutun (habituată) citochinin-independentă, izolată dintr-o linie citochinin-dependentă, a redevenit citochinin-dependentă atunci când a fost crescută la o temperatură de 16°C, dar nu şi atunci când a fost menţinută la 25°C. Este clar că diferenţele dintre liniile citochinin-independente şi cele citochinin-dependente se datorează unor schimbări ale fenotipului, aşa cum sunt modificările epigenetice, şi nu modificării genotipului.

Auxina naturală, acidul 3-indolilacetic (AIA), deşi se consideră că este destul de labilă, poate fi stabilizată prin conjugarea ei cu anumiţi aminoacizi (*Hangarter* şi *Good*, 1981). Dintre auxinele sintetice acidul 1-naftalenacetic (ANA) şi acidul 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D) sunt cele mai

comune şi cel mai des utilizate, pentru creşterea culturilor de calus şi de suspensii celulare vegetale. În funcţie de specia care este cultivată *in vitro*, cea mai activă auxină, 2,4-D-ul, poate fi întrebuinţată în concentraţii cuprinse între 0,1 şi 10 mg/l, cu toate că, în cazul palmierului, au fost necesare nivele extraordinar de ridicate, şi anume de 100 mg/l (*Oazis-Akins* şi *Vasil*, 1985).

Alte clase de regulatori de creştere, giberelinele, acidul abscisic şi etilena, pot controla procesele de morfogeneză şi de embriogeză somatică *in vitro*.

D. Vitaminele. Deşi vitaminele sunt sintetizate de către plantele crescute în condiţii naturale, se pare totuşi că aceşti compuşi sunt necesari pentru buna desfăşurare a proceselor metabolice care au loc în celulele şi în ţesuturile plantelor cultivate *in vitro*. Dintre ele, după *White* (1951), doar tiamina este universal necesară, afirmaţie demonstrată de *Gamborg* şi colaboratorii. (1968) în experimentele lor. Cu toate acestea, *Murashige* şi *Skoog* (1962) şi *Gamborg* şi colab. (1968) au folosit în alcătuirea mediilor nutritive, şi alte vitamine ca piridoxina şi acidul nicotinic. Au fost efectuate numeroase cercetări cu privire la efectul vitaminelor asupra creşterii culturilor calusale şi a suspensiilor celulare. Astfel, s-a observat că omiterea tiaminei, a acidului pantotenic, a cisteinei, a colinei şi a inozitolului, din mediul de cultură al suspensiilor celulare de *Acer pseudoplatanus*, a condus la reducerea semnificativă a intensităţii creşterii culturilor celulare; neutilizarea doar a uneia dintre substanţele enumerate mai sus, nu a avut nici un efect (*Stuart* şi *Street*, 1971).

Vitaminele pot avea şi alte efecte asupra culturilor de ţesuturi şi de celule vegetale. Astfel, în cazul culturilor celulare de paltin s-a observat că neadăugarea în mediul de cultură a compuşilor amintiţi mai sus, induce "agregarea anormală" a celulelor (*Stuart* şi *Street*, 1971). De asemenea, s-a constatat că la suspensiile celulare tumorale de tutun, prezenţa tiaminei în mediu are ca efect mărirea gradului de dispersie al celulelor. Tot în acest context, *Oswald* şi colaboratorii (1977) au arătat că adugarea vitaminei E (acetat de *dl*-alfa-tocoferol) în mediul de cultură, are ca efect stimularea creşterii ţesuturilor calusale şi stabilizarea suspensiilor celulare de *Zea mays*.

5.4.7.2.3. *Alţi factori*

A. Metodele de sterilizare. Mai multe componente care intră în alcătuirea mediilor nutritive, în momentul în care acestea sunt încălzite, pot să se descompună sau pot reacţiona cu alte componente. De aceea, este necesar ca astfel de nutrienţi să nu fie autoclavaţi alături de ceilalţi componenţi ai mediului. Ei pot fi sterilizaţi prin filtrare şi, apoi, vor fi adăugaţi în mediile

de cultură autoclavate. În acest sens, au fost efectuate mai multe experimente care au demonstrat că există posibilitatea ca unele surse de carbon, aşa cum este fructoza, să devină inhibitoare, după autoclavare, pentru creşterea culturilor de ţesuturi şi celule vegetale. De asemenea, s-a dovedit că anumiţi hormoni vegetali (AIA, AG_3 şi ABA) şi aminoacizi (glutamina) sunt termolabili. Deşi tiamina este degradată într-o anumită proporţie în urma încălzirii, din ea rămâne totuşi o cantitate suficientă, în mediile de cultură, după autoclavare.

B. Concentraţia ionilor de hidrogen. pH-ul celor mai multe medii de cultură se ajustează, înainte de autoclavare, la valori cuprinse între 5,5 şi 5,8. Concentraţia ionilor de hidrogen, din mediile de cultură, se modifică pe parcursul creşterii ţesuturilor şi celulelor vegetale. Aceste fluctuaţii au fost monitorizate, în special, la culturile de celule, unde s-a observat că valoarea pH-ului scade pe durata primelor zile de cultură, pentru ca, apoi, acesta să crească treptat. Majoritatea mediilor de cultură sunt slab tamponate, iar fluctuaţiile valorilor de pH pot produce inhibiţia creşterii celulare, atât la suspensiile cu densităţi mici ale celulelor, cât şi în cazul cultivării unei singure celule. Mediile tamponate cu acid 2-(N-morfolino) etansulfonic (MES) au avut caracteristici superioare faţă de cele netamponate, atât în cazul creşterii unei singure celule de *Datura innoxia* (pH 5,0 – 6,0), cât şi a creşterii coloniilor derivate din protoplaşti de *Santalum album* (*Oazis-Akins* şi *Vasil*, 1985).

Valoarea pH-ului poate scădea cu câteva zecimi, atunci când mediul este autoclavat; dar, această scădere, relativ mică, a pH-ului poate modifica procesele morfogenetice. O astfel de modificare s-a constatat pe parcursul duratei de cultivare în strat subţire, în mediu lichid, a celulelor de *Nicotiana tabacum* (*Cousson* şi *Tran Thanh Van*, 1981). Din culturile celulare de *Nicotiana tabacum*, în strat subţire, crescute pe mediul solidificat cu agar, se pot dezvolta flori. Formarea florilor în mediu lichid poate fi realizată prin controlarea pH-ului, modificarea echimolară a concentraţiei de AIB şi de chinetină, precum şi prin includerea în mediu a unor mici sfere de sticlă. Autorii amintiţi au arătat că efectul sferelor de sticlă asupra procesului de morfogeneză se datorează stabilizării pH-ului mediului de cultură, prin eliberarea în mediu a ionilor de sodiu şi de calciu, rezultaţi în urma descompunerii sferelor. În cazul culturilor celulare embriogene de *Daucus carota*, *Wetherell* şi *Dougall* (1976) au ajustat pH-ul mediului de cultură la intervale de 8 ore. În acest mod, ei au stabilit că pentru creşterea culturilor celulare de morcov, pH-ul optim a fost cuprins între 5,0 şi 6,0, iar pentru embriogeneză a fost de 5,4.

5.5. SISTEME DE CULTIVARE A SUSPENSIILOR CELULARE VEGETALE

În publicațiile apărute în literatura de specialitate sunt descrise o serie de sisteme de creştere a suspensiilor celulare vegetale, dar, în esență, există doar două mari categorii, şi anume: sisteme de tip "*închis*" şi sisteme de tip "*deschis*". În acest sens, *Wilson* (1980) şi *Kurz* şi *Constabel* (1981) au realizat o sinteză a principalelor trăsături ce caracterizează astfel de sisteme. După autorii respectivi, sistemele pot fi clasificate astfel:

A. Sisteme închise. În sistemul închis, culturile celulare sunt crescute într-un volum fix de mediu nutritiv, iar creşterea celulelor încetează atunci când nutrienții esențiali sunt epuizați. Dintre acestea menționăm:

a) cultura "batch" – se caracterizează prin aceea că celulele sunt crescute într-un volum limitat de mediu nutritiv. Majoritatea experimentelor se efectuează în vase conice menținute pe agitatoare de diferite tipuri, sau în fermentatoare diverse;

b) cultura continuă, închisă – în acest sistem, celulele din cultură sunt menținute în fermentator, iar introducerea de mediu proaspăt este echilibrată, prin scoaterea din fermentator a unui volum echivalent de mediu, astfel că, deşi numărul de celule se măreşte în continuu, volumul culturii este menținut constant. *Wilson* şi colaboratorii (1971) şi *Street* şi colaboratorii. (1971) au fost printre primii cercetători care au descris şi au utilizat un astfel de tip de fermentator. Sistemul de cultură continua închisă poate fi întrebuințat în studierea efectelor nutrienților sau a precursorilor metabolici, asupra producerii de metaboliți primari sau secundari. Astfel de sisteme pot fi folosite şi în experimentele cu suspensii celulare vegetale ale căror celule excretă în mediul de cultură anumiți compuşi. Într-un asemenea sistem trebuie efectuate mult mai multe analize şi experimente, pentru a determina modul în care pot fi menținute celulele un timp cât mai îndelungat, în asemenea condiții;

B. Sistemul semicontinuu – în acest sistem, un anumit volum de cultură este recoltat la intervale neregulate de timp şi este înlocuit cu un volum echivalent de mediu proaspăt. Cultura semicontinuă a fost utilizată pentru menținerea unui stoc de celule în cultură (celule aflate în faza de creştere exponențială), pentru o perioadă mai îndelungată de timp, pentru a se evita limitarea nutrienților în urma subcultivărilor frecvente. Astfel de culturi pot servi ca surse de inoculi uniformi (*Veliky* şi *Martin*, 1970), sau pot fi întrebuințate pentru efectuarea de studii metabolice şi fiziologice (*Eriksson*, 1965; *Eriksson*, 1967). Totuşi, din datele obținute din literatură, reiese că

prin această metodă nu poate fi realizată o echilibrare a creşterii celulelor aflate în cultură (*Veliky* şi *Martin*, 1970; *Verma* şi *Van Huystee*, 1971), deoarece introducerea de mediu proaspăt este controlată manual, la intervale neregulate de timp, operaţie care se aseamănă, întrucâtva, cu transferul culturilor practicat în sistemul închis, de tip "batch". Ca vase de cultură se folosesc recipientele de tip *Erlenmeyer* sau fermentatoarele.

C. Sistemele deschise – acestea se caracterizează prin realizarea unui schimb permanent de mediu nutritiv şi de celule, în sistem, prin introducerea şi respectiv scoaterea lor din vasele în care sunt crescute suspensiile. *Cultura continuă, deschisă*, se caracterizează prin adăugarea unui volum constant de mediu proaspăt la cultura aflată în stadiu de creştere, şi prin scoaterea unui volum echivalent şi constant de cultură (celule + mediu), creîndu-se în acest mod, condiţiile necesare pentru inducerea unei stări staţionare (stabile) a creşterii culturilor. Mediul de cultură determină o rată constantă de creştere a celulelor, astfel încât timpul de dublare al numărului de celule şi metabolismul general al acestora rămân constante, deci caracteristice pentru starea staţionară. În acest tip de cultură, există posibilitatea schimbării ratei de creştere a celulelor, prin modificarea intensităţii fluxului de mediu şi de celule, din interiorul sistemului. Astfel, creşterea celulelor poate fi examinată la diferite nivele ale ratei de creştere, prin analiza stărilor-staţionare corespunzătoare şi, de asemenea, este posibilă reglarea metabolismului celular, în scopul inducerii sintezei de metaboliţi secundari. Sistemul deschis continuu poate funcţiona sub formă de:

- *chemostat* – fermentator în care rata de creştere a celulelor aflate în cultură şi densitatea celulară rămân constante, datorită introducerii în vasul de cultură, într-o rată fixă, a unui nutrient limitator al creşterii celulelor;
- *turbidostat* – fermentator în care densitatea celulelor este uniform reglată (prin determinări densitometrice făcute prin intermediul unui fotodensitometru) şi este menţinută la un nivel predeterminat, prin adăugarea intermitentă a unui anumit volum de mediu proaspăt, concomitent cu scoaterea excedentului de celule (desigur împreună cu o anumită cantitate de mediu).

În cele ce urmează, vom analiza cele mai importante sisteme de cultură, şi anume: sistemul închis de tip "batch" şi sitemele deschise.

5.5.1. Creşterea celulelor în sistemul închis – cultura de tip "batch"

În sistemul "batch", celulele sunt crescute într-un volum limitat de mediu nutritiv, creşterea încetând atunci când nutrienţii din mediu sunt epuizaţi. Aşa cum am mai menţionat, ca recipiente pentru creşterea culturilor se pot întrebuinţa vasele de tip *Erlenmeyer* (de diferite volume) sau fermentatoarele.

În condiţii convenabile de creştere *in vitro*, celula vegetală îşi va mări volumul, pentru ca, ulterior, ea să se dividă (diviziunea este de tip mitotic) şi să formeze două celule fiice, capabile să crească în continuare. Astfel, creşterea celulară constă dintr-o succesiune a celor două procese, respectiv a *expansiunii* celulare (mărirea celulei în volum) şi a *multiplicării*. Adeseori, se poate întâlni şi cazul în care expansiunea celulară se produce, dar nu este urmată de diviziunea celulară. De aceea, celulele plantelor, în mod frecvent, îşi menţin viabilitatea fără ca procesul de diviziune să fie prezent. În culturile de celule, această situaţie se poate datora unor multitudini de cauze, cum ar fi: consumul nutrienţilor esenţiali din mediul de cultură; prezenţa unor compuşi toxici, în mediu; modificarea compoziţiei mediului; scăderea pH-ului mediului de cultură etc.

Creşterea culturilor poate fi considerată: a) la nivel celular, individual – *ciclul celular;* b) sau la nivel populaţional – *ciclul de creştere* a culturilor; iar tehnicile de măsurare a acestor cicluri sunt cele de rutină. După *King* şi colaboratorii, (1973) ciclul de creştere al unei culturi de suspensii celulare, crescute în sistemul "batch" (sau închis), se prezintă sub forma unei curbe sigmoide, aşa cum se poate observa în figura 53. În cadrul acestui ciclu sunt prezente câteva faze sau etape caracteristice evoluţiei culturilor, şi anume: *faza de lag* (sau de întârziere), *faza exponenţială sau faza logaritmică*, *faza lineară*, *faza de decelerație progresivă*, *faza staţionară* şi *faza de declin*.

În ceea ce priveşte desfăşurarea ciclului de creştere a celulelor aflate în cultură, există diferenţe între culturile celulare iniţiate din diverse specii, dar aceste variaţii sunt legate mai mult de durata fazelor de creştere. Este de subliniat faptul că, în cazul acestei curbe sigmoide de creştere, caracteristică pentru celulele cormofitelor, sunt de notat două aspecte mai importante. Primul aspect, remarcat de *Street* (1976), se referă la creşterea totală, sau generală, exprimată fie în greutatea biomasei celulare uscate, fie în numărul de celule, creştere care – în mod obişnuit – este în jur de 10 – 15 ori mai mare, faţă de nivelul iniţial. Astfel, numărul de celule poate să crească de la

o densitate de $0,2 \cdot 10^6$/ml, până la $3 \cdot 10^6$/ml. Al doilea aspect, constă în faptul că faza strict exponențială a creşterii este prezentă într-o proporție destul de redusă, astfel că din întreg ciclu de creştere, ea ocupă numai 2 – 3 generații de diviziuni celulare.

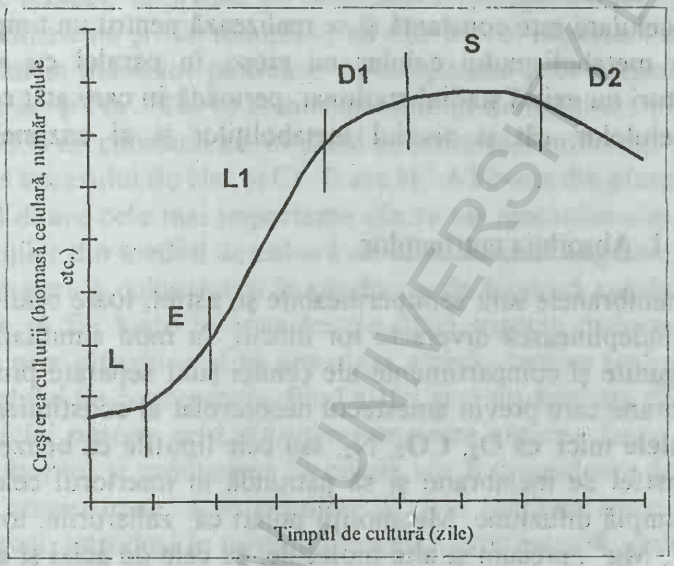


Fig. 53. Modelul curbei *ciclului* de creştere a suspensiilor celulare vegetale, cultivate într-un sistem închis , de tip "batch". L = faza de lag; E = faza exponențială; L1 = faza lineară; D1 = faza de decelerație; S = faza staționară; D2 = faza de declin (după *King* şi colab., 1973)

Termenul de "*ciclu de creştere*", întrebuințat pentru descrierea succesiunii normale a evenimentelor care se succed de la inocularea celulelor într-un volum fix de mediu, a fost preluat din microbiologie. În acest sens, s-a constatat că *faza exponențială* este o fază de creştere constantă a celulelor, flancată (în două părți) de două stadii trecătoare (ocazionale), şi anume: a) faza inițială, sau *faza de lag* (*faza de întârziere*), care urmează imediat după inocularea celulelor în mediul proaspăt (în care celulele se adaptează la noile condiții de mediu, respectiv la noile concentrații de nutrienți, pentru ca, apoi, acestea să treacă la o rată de creştere maximală) şi b) *faza staționară* ce se instalează din momentul în care majoritatea nutrienților din mediu sunt epuizați, pentru ca, apoi, cultura să treacă în c) *faza de declin* a creşterii, etapă în care numărul celulelor care mor este mult mai

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

mare decât a celor care se divid. Comparându-se mai multe culturi celulare realizate din diferite specii, s-a observat că ciclul lor de creştere este, în linii mari, destul de asemănător. Totuşi, este evident că, în cultura "batch" celulele suferă modificări permanente ale activităţii lor biosintetice. Astfel, s-a remarcat faptul că, în cazul anumitor suspensii celulare, deşi rata diviziunilor celulare este constantă şi se realizează pentru un timp scurt, alţi parametri ai metabolismului celular nu cresc, în paralel cu aceasta. La asemena culturi nu există stadiul staţionar, perioadă în care atât concentraţia relativă a celulelor, cât şi nivelul metaboliţilor şi al enzimelor, rămân constante.

5.5.1.1. Absorbţia nutrienţilor

Biomembranele sunt semipermeabile şi, astfel, toate celulele vegetale pot să-şi îndeplinească diversele lor funcţii, în mod simultan, deoarece diferitele organite şi compartimente ale celulei sunt separate prin biomembrane, membrane care previn amestecul necontrolat al constituienţilor acestora. Moleculele mici, ca O_2, CO_2, N_2, sau cele lipofile ca benzenul, pot să treacă prin astfel de membrane şi să pătrundă în interiorul celulei, foarte rapid, prin simplă difuziune. Metaboliţii polari ca: zaharurile, ioni ca: Na^+, K^+, H^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, precum şi alte molecule, ca cele de acizi şi aminoacizi, vor difuza liber, la o rată foarte scăzută. Ei pot să treacă prin biomembrane, prin intermediul canalelor proteice, a porilor sau a proteinelor de transport, aşa numitele sisteme "*carrier*" (termen sinonim cu permeaze) (*Wink*, 1993). Aceste sisteme *carrier* sunt, de fapt, proteine care intră în alcătuirea unor membrane celulare (în altele decât plasmalema) şi facilitează difuziunea, respectiv transportul activ al unor molecule, prin membrane. Modificările alosterice reversibile ale proteinelor sunt, probabil, responsabile pentru îndeplinirea funcţiei de transportor, iar în cazul transportului activ, aceste modificări conformaţionale sunt – în parte – legate de hidroliza ATP-ului. Proteinele de transport sunt: *uniport* (care captează un anumit tip de soluţie, pentru o anumită cale), *simport* (transportul unei soluţii depinde de transportul simultan al altei soluţii, în aceeaşi direcţie) şi *antiport* (atunci când transportul unei soluţii, înspre interiorul celulei, depinde de transportul simultan al unei alte soluţii, afară din celulă).

Multe dintre aceste descoperiri au fost realizate şi prin intermediul culturilor de ţesuturi şi celule vegetale. Astfel, *Murata* şi colab. (1994) au constatat că, în cazul menţinerii succesive a supensiilor celulare de tutun în medii cu concentraţii crescute de NaCl, are loc o scădere a permeabilităţii

canalelor din membrana plasmatică, față de K^+ și Na^+. În general, se acceptă ideea că celulele plantelor, în condiții de salinitate, trebuie să mențină un nivel mai ridicat al concentrației ionilor de potasiu, față de cel al ionilor de sodiu. Autorii amintiți considerau că sistemele pasive de transport ale ionilor (canalele ionice), împreună cu cele active (pompele ionice, antiporteri etc.), din plasmalemă și din tonoplast, ar juca un rol important în procesele prin care celulele plantelor păstrează, în citoplasma și în vacuola lor, acest raport dintre K^+ și Na^+. Tot în asemenea condiții de salinitate crescută, *Niu* și colab. (1993) au constatat că, în cazul celulelor cormofitelor, un rol activ în eliminarea excesului de Na^+ și Cl^- îl are H^+-ATP-aza din plasmalemă.

Unul dintre cele mai importante efecte ale mecanismului de absorbție al nutrienților din mediul de cultură de către celulele vegetale, se reflectă în rata de creștere a culturilor și în producția de biomasă celulară. În acest sens, trebuie să fie luate în considerație două aspecte majore, și anume: a) absorbția prin difuziune și b) absorbția activă, care se realizează împotriva gradientului de concentrație, fiind astfel și consumatoare de energie. În cazul *absorbției pasive, prin difuziune*, se poate anticipa faptul că rata de creștere a culturilor și producerea de celule vor fi dependente de concentrația externă, relativ mare, a nutrienților, și că o cantitate considerabilă din nutrienți inițiali, introduși în mediul de cultură, vor putea fi găsiți în acesta, la sfârșitul perioadei de creștere. În cazul *absorbției active*, rata de creștere va fi independentă de concentrația externă a nutrienților (la nivele relativ mari), iar producția finală de celule va fi dependentă de cantitatea de nutrienți introduși în mediu. La sfârșitul perioadei de creștere, vor rămâne în mediul de cultură doar puțini dintre nutrienții absorbiți prin intermediul sistemelor active. În concluzie, se pare că mecanismul absorbției nutrienților poate exercita influențe diverse asupra metabolismului și asupra controlului proceselor care se produc în celule, așa cum sunt diviziunea, sinteza metaboliților primari și secundari etc.

În scopul determinării *capacității de absorbție* a unor ioni și molecule, din mediul de cultură, de către celulele vegetale aflate sub formă de suspensii, au fost efectuate mai multe experimente. Dintre acestea, am selectat două exemple care credem că sunt edificatoare, cu privire la influența atât a concentrației inițiale a unor substanțe, cât și a speciei utilizate, asupra ratei de absorbție a celulelor. Astfel, *Belamy* și *Bieleski* (citați de *Dougall*, 1980), măsurând rata absorbției *fosfatului* de către suspensiile celulare de tutun aflate într-un mediu în care concentrația inițială a PO_4^{3-} era de 10^{-5} M (în mediul MS normal concentrația PO_4^{3-} este de 1,25 mM), au găsit că ea variază de la 17,3 nM/g/oră, în faza exponențială a curbei ciclului

celular, până la 135 nM/g/oră, în faza timpurie a stadiului staționar de creștere a celulelor.

În cadrul experimentelor efectuate cu suspensii celulare de *Berberis parvifolia*, *Deliu* și colaboratorii, (1992; 1994 b) au utilizat mediul *Gamborg* și colab. (1968), în care concentrația inițială a nutrienților analizați era cea normală, respectiv de 150 mg/l ($10^{-3,2}$ M) pentru PO_4^{3-}, de 2500 mg/l ($10^{-2,5}$ M) pentru NO_3^- și 20.000 mg/l pentru zaharoză. În urma rezultatelor obținute s-a observat că rata de absorbție a acestor substrate diferă în funcție de *stadiul ciclului de creștere* al suspensiei (fig. 54). Astfel, s-a constatat că rata maximă de absorbție a ionului fosfat are loc în faza de *lag* (ziua 2-3 de cultură), aceasta fiind de cca 6 µM (0,9 mg)/g substanță uscată/oră. După această fază, absorbția scade rapid, până în ziua a 8-a de cultură, moment în care PO_4^{3-} este complet epuizat din mediul de cultură. În cazul *azotatului*, absorbția maximă a avut loc în ziua a 6-a de cultură, rata lui fiind de 8,5 µM (0,85 mg)/g substanță uscată/oră, după care, în faza *exponențială* scade treptat, până la nivelul de 3 µM (0,3 mg)/g substanță uscată/oră. Acest nivel se menține chiar și în ziua a 18-a de cultură, etapă în care cultura se află în faza de declin a creșterii. Rata de absorbție a zaharozei a fost maximă în ziua a 4-a de cultură (30 mg/g substanță uscată/oră), zi în care suspensia celulară se afla în etapa de trecere de la faza de *lag* a creșterii, la cea *exponențială*. În continuare, nivelul ratei de absorbție a zaharozei a scăzut destul de rapid, acest substrat fiind în totalitate epuizat din mediu, în ziua a 16-a de cultură (faza staționară a ciclului ce creștere a celulcor aflate în cultură).

În lumina acestor rezultate, și a celor discutate mai sus, putem presupune că absorbția, respectiv transportul fosfatului și a zaharozei, din mediul de cultură, în interiorul celulelor, este un mecanism activ, iar azotatul intră în celule mai mult printr-un proces de difuziune, proces care face parte din categoria transportului pasiv.

Zaharoza este unul dintre hidrații de carbon care joacă un rol major în metabolismul plantelor superioare. Din acest motiv, interesul față de acest nutrient a crescut din ce în ce mai mult, studiile extizându-se de la urmărirea modului de transport și a mecanismului de intrare a moleculei de zaharoză în interiorul celulei vegetale, la cele de biologie și de genetică moleculară. Multe date rezultate în urma experimentelor efectuate cu culturi de suspensii celulare vegetale, atestă faptul că acest dizaharid – înainte de a pătrunde în celule – este hidrolizat de către o invertază extracelulară, iar produșii de hidroliză sunt absorbiți sub formă de monozaharide, respectiv de glucoză și

fructoză. Se pare că, una dintre excepții o reprezintă o linie celulară de sfeclă de zahăr, în care zahărul intră ca atare în celule, fără a fi hidrolizat (*Thorpe*, 1978).

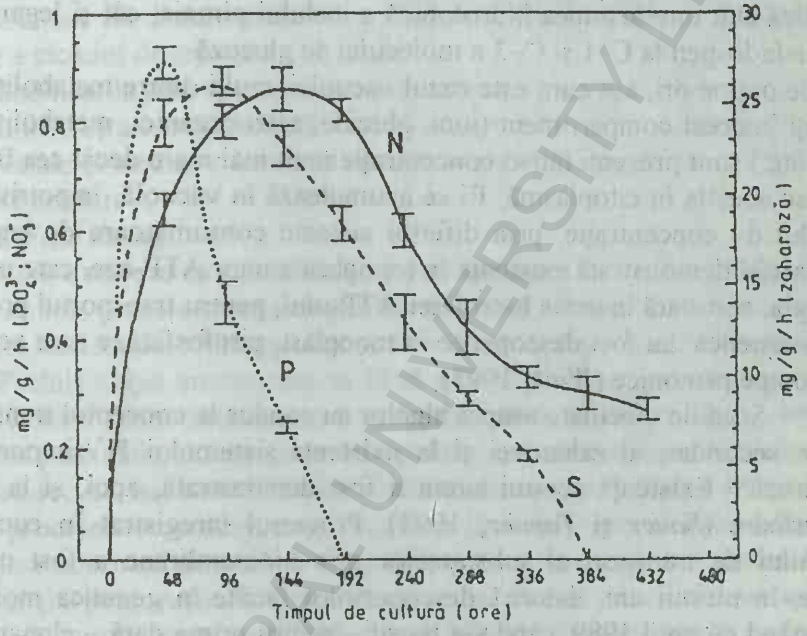


Fig. 54. Rata de absorbție a fosfatului (P), azotatului (N) și a zaharozei (S) din mediul de cultură, de către suspensiile celulare de *Berberis parvifolia*. Culturile au fost crescute în mediul *Gamborg* și colab. (1968), cu ANA (1,5 mg/l) și BA (0,3 mg/l) (după *Deliu* și colab., 1994 b)

De asemenea, s-au purtat discuții și asupra modului de pătrundere a mono- sau dizaharidelor în celule, și dacă acest transport al substratelor din mediu în celule, este activ sau pasiv. Unul dintre primele studii efectuate în acest context este și cel realizat de *Maretzki* și colab. (1974). Din acest studiu a reieșit faptul că absorbția glucozei se face în mod activ, deoarece ea are loc împotriva gradientului de concentrație, precum și faptul că ar exista situsuri specifice de transport, în membrana plasmatică. În anii care au urmat, astfel de studii s-au intensificat și au scos în evidență existența unui sistem activ de transport al glucozei, care a fost identificat nu numai în plasmalemă, ci și în alte endomembrane, cum sunt cele ale cloroplastelor (*Schäfer* și colaboratorii, 1977) și ale vacuolelor (*Martin*oia, 1992). S-a constatat că plasmalema celulelor vegetale cultivate *in vitro* posedă un

BCU CLUJ-NAPOCA BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

sistem de transport al glucozei de tip "carrier" proton-dependent, iar în culturile celulare fotoautotrofe de *Chenopodium rubrum* s-a demonstrat că acest sistem posedă o specificitate pentru substrat (*Gogarten* şi *Bentrup*, 1989), în care legarea substratului de către proteinele de transport a glucozei implică atât interacţiunea hidrofobică a inelului piranic, cât şi legarea ionului de hidrogen la C–1 şi C–3 a moleculei de glucoză.

Nu de puţine ori, aşa cum este cazul vacuolei, mulţi dintre metaboliţii încorporaţi în acest compartiment (ioni, glucide, acizi organici, metaboliţi secundari etc.) sunt prezenţi într-o concentraţie mult mai mare decât cea în care se găsesc aceştia în citoplasmă. Ei se acumulează în vacuolă, împotriva gradientului de concentraţie, prin diferite sisteme consumatoare de energie. A fost astfel demonstrată existenţa în tonoplast a unor ATP-aze, care utilizează energia, rezultată în urma hidrolizei ATP-ului, pentru transportul protonilor. De asemenea, au fost descoperite în tonoplast, pirofosfataze care acţionează ca pompe protonice (*Wink*, 1993).

Studiile efectuate asupra algelor au condus la conceptul transportului activ, secundar, al zaharozei şi la existenţa sistemului H^+/simport pentru zaharoză. Existenţa acestui sitem a fost demonstrată, apoi, şi la plantele superioare (*Sauer* şi *Tanner*, 1993). Progresul înregistrat în cunoaşterea modului de transport al substanţelor prin biomembrane a fost mult mai mare, în ultimii ani, datorită descoperirilor făcute în genetica moleculară. Începând cu anul 1989, când s-a reuşit – pentru prima dată – clonarea a trei sisteme de transportori din membranele plasmatice ale celulelor cormofitelor, respectiv H^+-ATPaza, din plasmalemă (*Harper* şi colab., 1989), translocatorul fosfatului, din membrana internă a cloroplastelor (*Flögge* şi colab., 1989) şi simporterul pentru H^+/glucoză, din plasmalemă (*Sauer* şi *Tanner*, 1989), au fost clonate foarte multe proteine de transport (carriers) şi canale proteice (*Anderson* şi colab., 1992; *Riesmeier* şi colab., 1992; *Tsay* şi colab., 1993).

5.5.1.2. Modificările morfofiziologice care apar pe durata ciclului de creştere

Absenţa unei aşa numite "balanţe" a creşterii, se reflectă în modificări marcante ale metabolismului celular, ca de exemplu: sinteza proteinelor şi a acizilor nucleici; rata respiraţiei; activitatea unor enzime (fenilalaninamoniumliaza, glucozo-6-fosfat dehidrogenaza, nitratreductaza etc.), modificări constatate la suspensiile celulare de *Acer*, *Rosa* şi *Glycine* (*Wilson*, 1980). Deoarece ratele de sinteză ale diferiţilor metaboliţi celulari

sunt în corelație cu rata diviziunilor celulare în sistemul "batch", schimbările în compoziția celulară sunt semnificative și survin sub toate aspectele, în timpul ciclului celular. Aceste modificări secvențiale se desfășoară din momentul inducerii condițiilor necesare pentru trecerea de la starea de nondiviziune la cea de diviziune activă a celulelor, până la atingerea *stadiului staționar* a ciclului de creștere.

Modificările care se produc în alcătuirea mediului de cultură, pe timpul unui ciclu de creștere, se datorează schimbului permanent de substanțe, ce are loc între celule și mediu, și diferă în funcție de faza de creștere în care se află suspensiile celulare.

A. Faza de lag.

După transferarea celulelor în mediul proaspăt, modificările metabolice care au loc, pregătesc celulele pentru diviziune. Astfel, creșterea intensă a nivelului nucleotidelor libere (datorate în special, nivelului UDP-glucozei și al ATP-ului) a fost interpretată ca fiind esențială pentru pregătirea următoarelor sinteze (cum este aceea a polizaharidelor, indispensabile pentru construirea peretelui celular), precum și pentru aprovizionarea cu un substrat energetic adecvat, necesar eliberării eficiente de energie indispensabilă desfășurării proceselelor endergonice, implicate în diviziunea celulară. Mărirea transitorie a activității de oxidare a hidraților de carbon, prin intermediul căii glicolitice, și a pentozofosfaților, pe durata fazei de *lag*, a fost interpretată ca un mijloc de aprovizionare a celulelor cu NADPH, alături de ATP, ca factor generator de energie ce este necesară în procesele de biosinteză (*Street*, 1977). De asemenea, se mărește și activitatea invertazei (zaharoza este absorbită de către celule sub formă scindată, iar scindarea se realizează de către o invertază, existentă în peretele celular), activitate care este asociată cu sinteza compușilor necesari construcției peretelui celular. Tot în faza de lag, s-a constatat sporirea conținutului celular în ADN și în ARN, precum și creșterea ratei de sinteză a proteinelor totale, datorată – în mare parte – unei capacități translaționale ribosomale, mai eficiente (*Lindsey* și *Yeoman*, 1985). De asemena, are loc absorbția fosforului și apoi a NH_4^+, modificându-se, în acest mod, raportul dintre ionii de azotat și cei de amoniu, astfel că pH-ul mediului devine acid. În acest moment, cultura celulară trece din faza de *lag*, în *faza exponențială* de creștere. Desigur că, în faza de *lag* sunt consumați și alți compuși, cum sunt azotații și zaharoza, dar într-o proporție mult mai redusă. În general, se presupune că, există un echilibru între absorbția și eliminarea unor substanțe ionizate. Celulele, cultivate sub formă de suspensie, pot echilibra concentrația ionilor de hidrogen la valori optimale.

Dintre modificările structurale ale celulelor se remarcă, cu precădere, scăderea volumului vacuolelor şi creşterea volumului citoplasmatic.

B. Faza de diviziune celulară intensă (exponenţială şi lineară)

În faza exponenţială (sau logaritmică), o dată indusă diviziunea celulelor, care este foarte activă, s-a constatat că rata sintezei de ADN scade la minimum. De fapt, sinteza de ADN este strâns corelată cu rata diviziunii celulelor. Astfel, s-a observat că la culturile de *Rosa* sp. şi la cele de *Acer pseudoplatanus*, sinteza de ADN este iniţiată înainte de intrarea celulelor în faza de diviziune şi încetează după intrarea suspensiilor celulare în faza exponenţială de creştere. Perioada în care conţinutul de ADN, per celulă, a rămas constant (timpul în care citochineza şi sinteza de ADN au continuat în mod neîntrerupt şi la aceeaşi rată), a fost foarte scurtă, respectiv de 72 de ore (*Street*, 1977). În cazul sintezei altor acizi nucleici, s-a constatat că (de exemplu în culturile celulare de *Helianthus tuberosum*) nivelul ARN-ului se măreşte puternic, după primele trei zile de cultură, pentru ca apoi aceasta să scadă rapid, concomitent cu sporirea intensităţii diviziunii celulare (*Lindsey* şi *Yeoman*, 1985).

Pe durata fazei *exponenţiale* de creştere, mai mulţi parametri pot să prezinte măriri exponenţiale, la rate diferite. Astfel, la culturile de *Acer pseudoplatanus* s-a constatat că, pe durata a trei generaţii, rata specifică de creştere a celulelelor a fost constantă, dacă ea a fost determinată pe baza numărului de celule, a substanţei uscate şi a conţinutului în proteine. Totuşi, rata acumulării de substanţă uscată sau de proteine a fost mai mică, decât sporirea numărului de celule. Din acest motiv, compoziţia culturilor celulare trece, în continuu, prin numeroase schimbări (*King* şi colab., 1973).

În faza *exponenţială* de creştere a culturilor, mai au loc o serie de modificări în activitatea unor enzime. În acest sens, s-a remarcat o sporire a activităţii invertazei acide şi neutre, mai ales spre sfârşitul fazei. De asemenea, tot în această perioadă scurtă, s-a constatat mărirea activităţii unor glicozidaze, a amilazelor şi a peroxidazelor. Astfel de modificări sunt foarte greu de interpretat, deoarece nu toate celulele se află în acelaşi stadiu (fază) a ciclului lor celular.

Intensificarea procesului de diviziune are drept rezultat mărirea numărului de celule, care conduce, în mod normal, la creştera biomasei celulare, observându-se – în acelaşi timp – o micşorare a dimensiunii celulelor. De fapt, celulele din suspensiile celulare, aflate în această fază, se aseamănă, într-o oarecare măsură, cu cele meristematice din apexul caulinar sau radicular. În acest context, studiile efectuate atât asupra ultrastructurii celulelor din rădăcinile de *Berberis parvifolia*, cât şi a culturilor celulare induse din

ele, au scos în evidență o serie de aspecte. Astfel, secțiunile ultrafine efectuate prin apexul rădăcinilor prezintă trăsături caracteristice meristemului primar, celulele fiind mici, izodiametrice și așezate în șiruri (fig. 55a). Ele au un perete celular subțire, o citoplasmă foarte densă și un nucleu mare (cu nucleol), situat în centrul celulei. În citoplasmă mai sunt prezente vacuole foarte mici, multe profile ale reticulului endoplasmic rugos, multe mitocondrii și dictiozomi; nu se observă spații intercelulare (fig. 55b). (*Deliu* și colab., 1994 a).

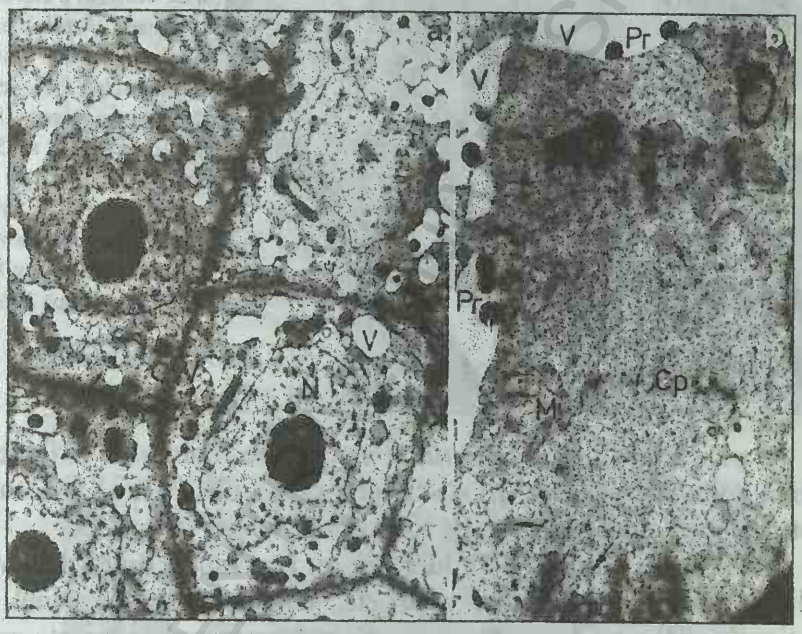


Fig. 55. Ultrastructura meristemului apical al rădăcinilor de *Berberis parvifolia* (a). Nucleu (N), nucleol (nl), perete celular (CW), vacuole (V); x 3800. Ultrastructura unei celule meristematice aflate în telofază (b). Mitocondrii (M), mase cromatice polare (Pcm), placa celulară (Cp), precipitate electrondense (Pr); x 5400 (după *Deliu* și colab. 1994 a)

Ultrastructura celulelor de *Berberis parvifolia* cultivate *in vitro*, aflate în faza *logaritmică* de creștere, confirmă cele relatate mai sus, și anume că celulele aflate în acest stadiu se aseamănă cu cele meristematice. Astfel, citoplasma este abundentă, nucleul este mare și ocupă o poziție centrală, vacuolele sunt mici și numeroase, și nu se distinge încă prezența vacuolei centrale. De asemenea, în citoplasmă se remarcă prezența multor profile ale reticulului endoplasmic rugos, multe mitocondrii și dictiozomi, și foarte puține amiloplaste (fig. 56) (*Deliu* și colab., 1994 a). Aceste aspecte au mai

fost observate şi în alte suspensii celulare (*Acer pseudoplatanus*, *Rosa* sp.), şi sunt caracteristice pentru celulele aflate în stadiul de diviziune activă (*Street*, 1977).

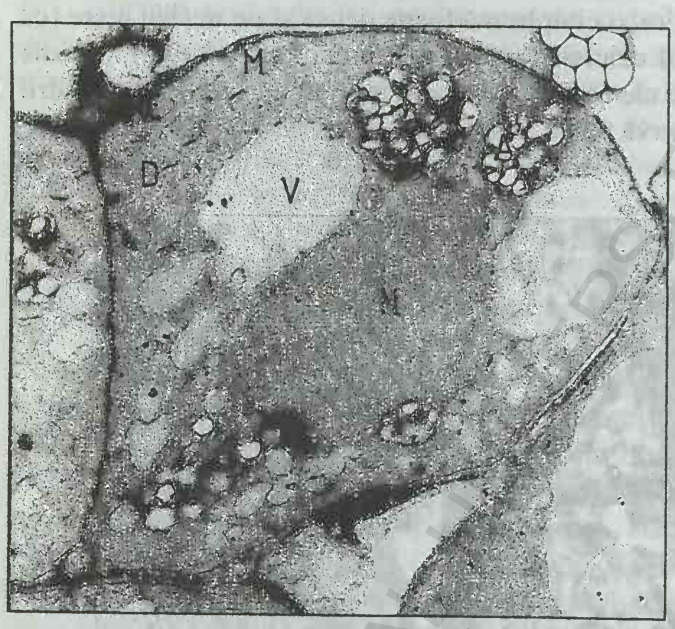


Fig.56. Ultrastructura celulelor de *Berberis parvifolia* cultivate *in vitro*, aflate în faza *exponenţială* (ziua a 5-a de cultură) a ciclului lor de creştere. Amiloplaste (A), dictiozom (D), mitocondrii (M), nucleu (N), reticul endoplasmic rugos (RE), vacuole mici (V); x 5500. Culturile de suspensii celulare au fost crescute în mediul *Gamborg* şi colab. (1968) cu ANA (1,5 mg/l) şi BA (0,3 mg/l) (după *Deliu*, 1991)

Pe parcursul fazei *exponenţiale* mai au loc o serie de modificări în alcătuirea culturilor celulare. În acest context, s-a observat că procentul de agregate celulare scade marcant, pe toată durata etapei *logaritmice*.

Street (1977) a descris în lucrarea sa, mai multe tipuri de diviziuni ale celulelor de morcov, paltin, tutun etc., cultivate *in vitro*. Unul dintre aceste tipuri, observate la morcov, constă în formarea de agregate celulare de tip moruloid, agregate care îşi au originea într-o singură celulă, sferică sau ovală, care se divide în plan ecuatorial. Astfel de situaţii nu sunt unice, ele fiind întâlnite şi la alte suspensii celulare, aşa cum sunt cele de *Berberis parvifolia*. În imaginea din figura 57 se observă o celulă ovală la care diviziunea a avut loc în plan ecuatorial, din aceasta rezultând două celule fiice, care rămân alipite (*Deliu*, date nepublicate). De asemenea, se remarcă prezenţa unui şir de trei celule, din care cea centrală este mai mică, ceea ce sugerează faptul că, diviziuni alăturate pot să dea naştere unei astfel de formaţiuni.

În continuare, este posibil ca celulele – aflate de o parte şi alta a celulei centrale – să se dividă, aşa cum arăta *Street* (1977), în unghi drept, fără să se desprindă una de alta, şi astfel să dea naştere acelor mase de tip

moruloid, care se pot observa şi în culturile celulare de *Berberis parvifolia* (fig. 57).

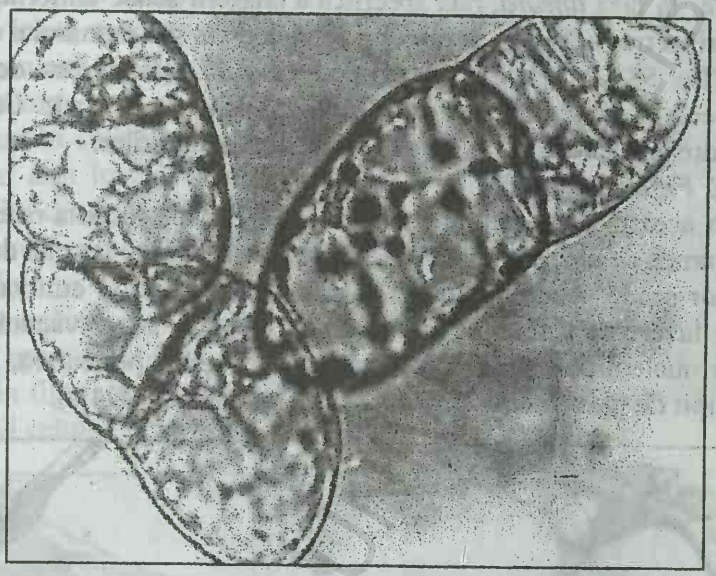


Fig. 57. Celule de *Berberis parvifolia* cultivate *in vitro* şi aflate în faza de diviziune activă (ziua a 5-a de cultură). Mediul de cultură al culturilor de suspensii este *Gamborg* şi colab., (1968) cu ANA (1,5 mg/l) şi BA (0,3 mg/l) (după *Deliu*, date nepublicate)

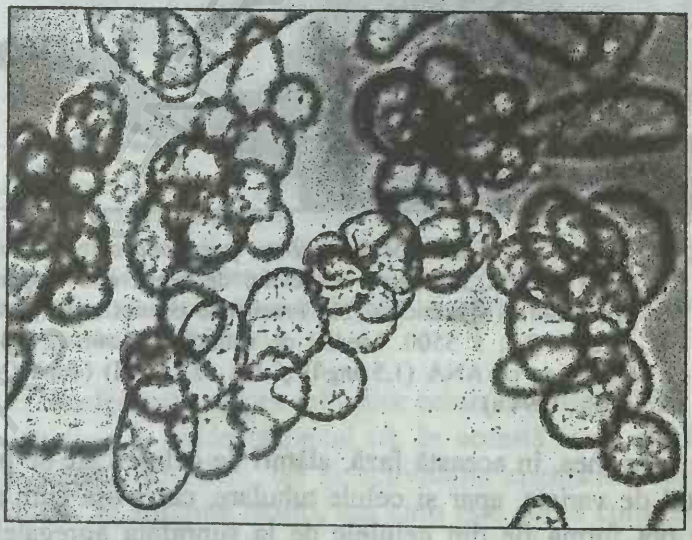


Fig. 58. Culturi celulare de *Berberis parvifolia* aflate în etapa lineară (zilele 6 – 7) a ciclului lor de creştere. Mediul de cultură – *Gamborg* şi colab., (1968) cu cu ANA (1,5 mg/l) şi BA (0,3 mg/l) (după *Deliu*, date nepublicate)

Desigur că, în faza *exponențială* a ciclului de creştere a suspensiilor celulare, ca şi în cea *lineară,* se continuă absorbţia masivă a unor nutrienţi din mediu. În faza *lineară*, rata specifică a creşterii scade uniform, observându-se mărirea treptată atât a volumului celulelor, cât şi a numărului de agregate celulare (fig. 58). În celule apare vacuola centrală, nucleul este deplasat spre periferia celulei, iar raportul dintre citoplasmă şi vacuolă scade. Cultura celulară se îndreaptă spre faza *staţionară* de creştere a culturilor.

C. Faza staţionară

În această fază, celulele se măresc în volum, vacuola ocupă aproape întregul lumen celular, împingând citoplasma la periferie, iar rata de diviziune a celulelor scade. Astfel, celulele de *Berberis parvifolia* cultivate *in vitro*, aflate în faza staţionară a ciclului lor de creştere, au o vacuolă centrală, mare, iar nucleul este situat împreună cu citoplasma peliculară, la periferia celulei, lipit de plasmalemă (fig. 59) (*Deliu* şi colab., 1994 a).

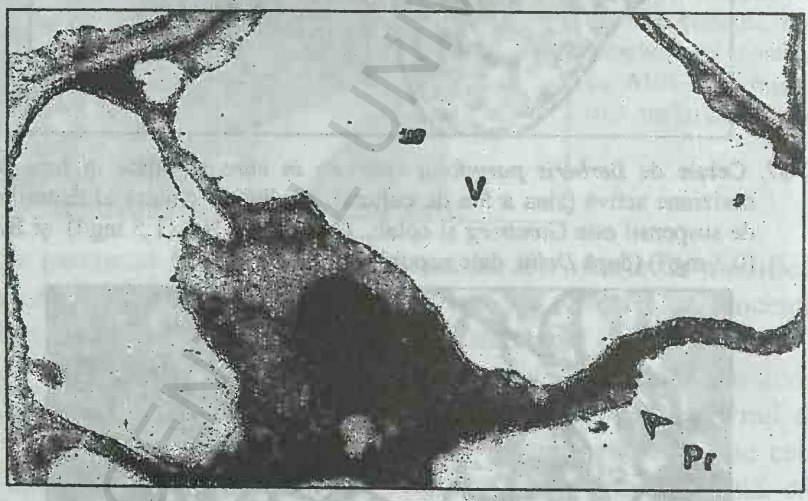


Fig. 59. Ultrastructura celulelor de *Berberis parvifolia* cultivate *in vitro*, aflate în faza *staţionară* a ciclului de creştere a suspensiilor. Mitocondrii (M), nucleu (N), Precipitate osmiofile (Pr), vacuolă centrală (V); x 5500. Mediul de cultură – *Gamborg* şi colab. (1968) cu cu ANA (1,5 mg/l) şi BA (0,3 mg/l) (după *Deliu* şi colab., 1994 a)

De asemenea, în această fază, alături de celule care se prezintă sub forme destul de variate, apar şi celule tubulare, care, aşa cum arăta *Street* (1977), se pot forma fie din celulele de la suprafaţa agregatelor, fie din celule libere. Celulele cu formă tubulară se pot întâlni, în mod obişnuit, în etapa *staţionară* a ciclului de creştere, la majoritatea culturilor de celule

vegetale, aşa cum sunt şi cele de *Berberis parvifolia*, culturi aflate în ziua a 14-a de cultură (fig.52 şi fig. 60 a şi b) (*Deliu*, date nepublicate). După cum se poate observa din imaginile prezente în figura 60, în astfel de celule pot avea loc diviziuni repetate, însoţite de apariţia unui perete celular, dispus transversal sau oblic. Celulele fiice nu se despart şi formează şiruri uniseriate de celule tubulare.

Uneori în culturile celulare de morcov aflate în stadiul *staţionar* de creştere, mai ales în cele induse din ţesutul cotiledonar al plantulelor de arahide, multe celule sferice prezintă – la suprafaţa lor – mici excrescenţe sub forma unor papile (*Street*, 1977). În continuare, aceste papile se vor mări în volum şi se vor despărţi de celula mamă, printr-un proces de diviziune, asemănător cu cel observat la drojdia de bere (*Saccharomyces cerevisiae*), aşa numitul proces de înmugurire. Aşa cum se remarcă şi în imaginile din figura 61, este posibil ca un astfel de fenomen să apară şi la alte suspensii celulare, cum sunt cele de *Berberis parvifolia*.

Fig. 60. Celule tubulare de *Berberis parvifolia*. a) Formarea pereţilor transversali, interni, care duce la apariţia şirurilor de celule tubulare; b) celule tubulare, uniseriate, cu pereţi interni transversali sau oblici şi mici agregate celulare. Culturile celulare se află în ziua a 14-a de cultură, faza *staţionară*. Mediul de cultură al suspensiilor celulare a fost *Gamborg* şi colab. (1968), cu ANA (1,5 mg/l) şi BA (0,3 mg/l) (după *Deliu*, date nepublicate)

Analizele efectuate asupra culturilor celulare aflate în faza *staţionară* de creştere, au scos în evidenţă faptul că, în această etapă scade atât rata respiraţiei şi sinteza de ARN, cât şi activităţile enzimelor cheie ale căii pentozofosfaţilor. În anumite cazuri, aşa cum este cel al culturilor celulare de *Solanaceae*, faza staţionară este asociată cu iniţierea organizării struc-

turale a celulelor, care, la rândul ei, este însoţită de o mărire a acumulării în celule a metaboliţilor secundari, respectiv a alcaloizilor.

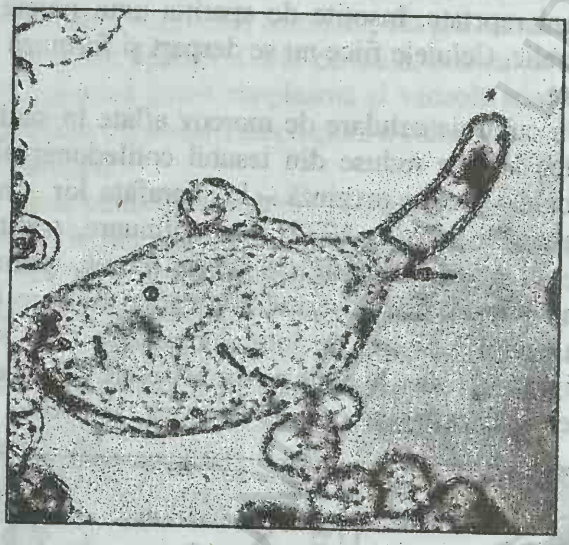


Fig. 61. Celule sferice de *Berberis parvifolia* la care există posibilitatea ca noile celule fiice (marcate cu săgeată) să se formeze în urma unui aşa numit proces de înmugurire, observat la *Saccharomyces cerevisiae.* Mediul de cultură al suspensiilor celulare a fost *Gamborg* şi colab. (1968) cu ANA (1,5 mg/l) şi BA (0,3 mg/l) (după *Deliu*, date nepublicate)

Diferenţierea structurală, cât şi cea biochimică, diferenţieri care au loc în faza *staţionară*, pot fi explicate prin modificările concomitente ale activităţii sistemelor enzimatice, specifice. Astfel, studiindu-se metabolismul polifenolilor, în culturile celulare de *Camellia sinensis,* s-a găsit că activitatea polifenoloxidazei este invers proporţională cu rata creşterii celulare. Totuşi, variaţiile care se produc în timp, nu sunt doar simple modificări metabolice care au loc pe parcursul ciclului de creştere (*Lindsey* şi *Yeoman,* 1985).

De foarte multe ori, atât potenţialul biosintetic, cât şi cel morfogenetic se schimbă (în mod normal scade) pe durata efectuării subcultivărilor succesive, iar o astfel de variabilitate poate fi considerată că prevede fundalul pe care se produce heterogenitatea legată de fazele de creştere. În continuare, ca o consecinţă a consumului unei părţi importante a nutrienţilor din mediu, aceştia vor deveni factori limitanţi ai creşterii, astfel că rata de diviziune a celulelor va descreşte în continuare şi cultura va intra în faza de

declin, din cauza epuizării compuşilor nutritivi esenţiali şi/sau acumulării unor inhibitori ai creşterii, în mediul de cultură.

Durata fiecărei faze (cele mai scurte fiind faza de *lag* şi faza *exponenţială* de creştere) se măsoară în zile şi depinde de mai mulţi factori, amintiţi anterior, aşa cum sunt: densitatea inoculului, specia, condiţiile de mediu etc.

5.5.1.3. Durata ciclului celular

Aşa cum am mai arătat, culturile de ţesuturi şi celule vegetale sunt alcătuite din mai multe populaţii de celule, care diferă unele de altele şi din punct de vedere morfologic. Această diversitate morfologică se poate datora, printre altele, şi faptului că celulele cultivate *in vitro* se află, într-un anumit moment al creşterii suspensiei celulare, în etape diferite ale ciclului lor celular.

Cromozomii din celulele plantelor pot fi observaţi printr-o serie de metode, dintre care cele mai cunoscute sunt: utilizarea microscopului cu interferenţă şi cu contrast de fază, precum şi colorarea celulelor cu reactiv Feulgen sau cu DAFI (diamidino-2-fenilindol).

Prin utilizarea tehnicii cu timidină tritiată (^{3}H-timidină) s-a reuşit calcularea timpului necesar trecerii celulelor printr-un ciclu complet de diviziune şi de creştere. O altă tehnică care poate fi întrebuinţată, în acest scop, este combinaţia dintre microspectrofotometrie şi autoradiografie. Durata absolută a ciclului celular se calculează din curba de creştere a culturii, respectiv din segmentul de curbă corespunzător fazei *exponenţiale* de creştere. La plantele intacte, durata ciclului celular variază în funcţie de specie şi de poziţia în plantă a ţesutului meristematic luat în studiu. În acest context, a fost posibil ca, în anumite situaţii, să se realizeze o comparare directă a celulelor vegetale *in vivo*, cu cele cultivate *in vitro* (*Bayliss*, 1985). În urma rezultatelor obţinute s-a observat că, în general, la celulele cultivate *in vitro* durata ciclului celular este mult mai mare, datorită, în special, măririi duratei perioadei G_1, perioada cea mai scurtă fiind înregistrată în cazul mitozei propriu-zise (tabelul 14).

Durata perioadelor ciclului celular al celulelor vegetale cultivat *in vitro* poate fi calculată printr-o combinare a metodei de determinare a indexului mitotic, cu tehnica timidinei marcate. Corelaţia dintre indexul mitotic şi durata bazelor ciclului celular este în funcţie de distribuţia vârstei celulelor, în populaţie.

Tabelul 14. Variația duratei ciclului celular, la celule din plante și la cele aflate *in vitro*, în culturi celulare (după *Street*, 1977 și *Bayliss*,1985)

Specia	Durata fazei din cadrul ciclului celular (ore)				
	T	G_1	S	G_2	M
Daucus carota (rădăcină)	7,5	1,3	2,7	2,9	0,6
Daucus carota (cultură celulară)	51,2	39,6	3,0	6,2	2,4
Zea mays (rădăcină)	9,9	1,7	5,0	2,1	1,1
Zea mays (cultură celulară)	37,0	23,9	7,1	3,9	2,1
Haplopappus gracilis (rădăcină)	11,9	1,4	6,8	2,6	1,2
Haplopappus gracilis (cultură celulară)	23,4	9,5	7,3	5,0	1,8

T = durata totală a ciclului celular; G_1 = faza presintetică: sinteza enzimelor necesare pentru replicarea ADN; S = faza sintetică: replicarea bidirecțională a ADN și sinteza histonelor; G_2 = faza postsintetică: creșterea celulelor în volum și sinteza proteinelor necesare pentru mitoză; M = mitoza, pe durata căreia cromozomii sunt distribuiți în mod egal la cele două celule fiice, rezultate în urma mitozei

În general, în culturile celulare sunt luate în calcul două distribuții, și anume: a) aceea din stadiul staționar al creșterii, în care numărul total de celule, per unitate de volum, este constant; b) aceea din faza exponențială a creșterii. În acest sens, repartiția celulelor în cadrul ciclului de creștere a culturii,în funție de perioada ciclului celular în care se află, se pare că depinde mai mult de gradul de heterogenitate al suspensiilor, decât de specia din care ele au fost induse. Astfel, studiind rezultatele obținute în urma analizelor efectuate asupra conținutului în ADN, per celulă, la culturile celulare de *Acer pseudoplatanus* și *Rosa* sp., *Street* (1977) sugera că: a) în cazul ambelor specii, în faza *staționară* de creștere a culturilor, majoritatea celulelor se află în perioada G_1; b) în faza de *lag*, fiecare celulă trece prin perioada S, de replicare a ADN-ului; c) pe durata fazei *exponențiale* a creșterii, perioada predominantă este corespunzătoare fazei G_2 a ciclului celular; d) mărirea *timpului mediu de generație* înaintea fazei *staționare*, se datorează unei extensii a perioadei G_1. *Timpul mediu de generație*, este considerat ca fiind sinonim, în majoritatea cazurilor, cu timpul de dublare a numărului de celu-

le, respectiv a biomasei. Dar, timpul de dublare se referă la totalul populațiilor de celule şi nu este strict identic cu media timpului de generație a celulelor individuale.

Diferența dintre țesuturile plantelor şi culturile inițiate din acestea, ele se reflectă într-o anumită măsură şi în morfologia lor. Dacă ne referim la celulele de tip meristematic, din țesuturile plantelor intacte şi la celulele cultivate *in vitro*, diferențele care se observă sunt şi mai pregnante. Astfel, celulele meristematice sunt mici, cu citoplasmă densă, cu nucleu mare etc. (vezi figura 55), pe când cele prezente în culturile *in vitro*, mai ales în stadiul *staționar* al ciclului lor de creştere, sunt mult mai mari şi prezintă o vacuolă centrală, cu un volum foarte mare (vezi figura 59). Aceste aspecte ne sugerează faptul că nivelul de auxină, necesar suprimării diferențierii celulelor cultivate *in vitro*, exercită un efect inhibitor asupra desfăşurării ciclului celular.

5.5.2. Creşterea celulelor în sisteme deschise

5.5.2.1. Chemostatul

Pentru realizarea unor condiții de creştere a culturilor celulare vegetale, în sisteme deschise, în vase de cultură mai mari de 1 litru, denumite fermentatoare sau bioreactoare, este necesară cunoaşterea unor date cu privire la anumiți parametri de cinetică. Utilizarea chemostatelor şi a turbidostatelor în creşterea microorganismelor este practicată în mod curent, dar sistemul continuu de creştere a celulelor vegetale ridică mult mai multe probleme. Astfel, spre deosebire de microorganisme, datorită dimensiunilor şi a tendinței de a forma agregate, celulele cormofitelor cultivate *in vitro* îşi pierd rapid capacitatea de a rămâne sub formă de celule autonome, suspendate în lichid.

Combinația dintre rata de creştere relativ scăzută ($\mu_{max} \leq 0{,}04$/oră) şi sensibilitatea destul de mare a celulelor vegetale cultivate *in vitro* față de forțele hidrostatice, sau de forfecare, care pot lua naştere în bioreactoarele agitate cu rotoare cu palete, conduce la concluzia că sistemele de cultură continuă, întrebuințate pentru cultivarea microorganismelor, pot fi utilizate pentru creşterea celulelor vegetale, dar numai după efectuarea de multiple modificări.

Creşterea suspensiilor celulare vegetale în chemostat oferă o serie de avantaje, în ceea ce priveşte investigarea metabolismului celular, deoarece în acest sistem există posibilitatea creşterii celulelor, pe o perioadă îndelungată de timp şi controlarea lor prin selecția şi prin utilizarea unui singur nu-

trient, limitator al creşterii. De asemenea, acest sistem permite ca investigaţiile să fie efectuate nu numai în stadiul de creştere echilibrată a celulelor, dar şi pe durata creşterii neechilibrate, atunci când celulele se află în tranziţie de la o stare staţionară la alta, şi când în cultură au loc mult mai multe modificări metabolice (*Kurz* şi *Constabel*, 1981).

După *Wilson* (1980), esenţa operaţiilor chemostatului constă în faptul că diviziunea celulelor are loc în condiţiile unei stări staţionare şi la o rată uniformă aflată sub controlul unui anumit nutrient, limitatator al creşterii celulare. Acest nutrient diferă, dar în general, el este unul din cei esenţiali, aşa cum sunt: ionii de fosfat sau de azotat, ori sursa de carbon. Pentru ca acest nutrient să devină factor limitator al creşterii celulare, el trebuie să fie adăugat în mediul de cultură al suspensiilor celulare aflate în chemostat, în concentraţii mult mai mici decât cele normale. În aceste condiţii, creşterea devine echilibrată, în sensul că densitatea celulelor rămâne constantă, ea fiind corelată cu rata de diviziune a celulelor şi cu rata de adăugare a nutrientului limitator. Unul dintre cele mai simple forme de chemostat constă dintr-un vas, în care mediul proaspăt este adăugat continuu, într-un volum fix, la cultura de celule care creşte. Compoziţia mediului adăugat este ajustată în aşa mod, încât numai un singur nutrient să devină factor limitator. Creşterea celulelor, la o rată determinată, depinde de rata de adăugare a mediului şi de rata scoaterii din vas a culturii celulare. O dată ce creşterea celulelor ajunge într-o fază de stare *staţionară*, rata diviziunii celulelor este egală cu rata diluţiei obţinută prin adăugarea de mediu proaspăt. În sfârşit, rata de creştere este determinată de concentrţia nutrientului limitator al creşterii, din starea *staţionară*.

În chemostat, rata diviziunii celulare (μ) este corelată cu concentraţia substratului limitator, al creşterii. În mediul în care toţi componenţii esenţiali sunt în exces, cu excepţia substratului limitator al creşterii, rata diviziunii celulare a fost găsită de *Monod* (1950) ca fiind legată de concentraţia substratului limitator aşa cum rezultă din figura 62 (*King* şi colab., 1973).

Pentru diferite tipuri de microorganisme, curbele experimentale se pot calcula după ecuaţia sugerată de *Monod* (1950):

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

unde: S = concentraţia substratului limitator în cultură
K_s = concentraţia substratului care permite înjumătăţirea ratei maxime de creştere
μ = rata specifică de creştere, pentru concentraţia substratului limitator

μ_{max} = rata maximă a creşterii

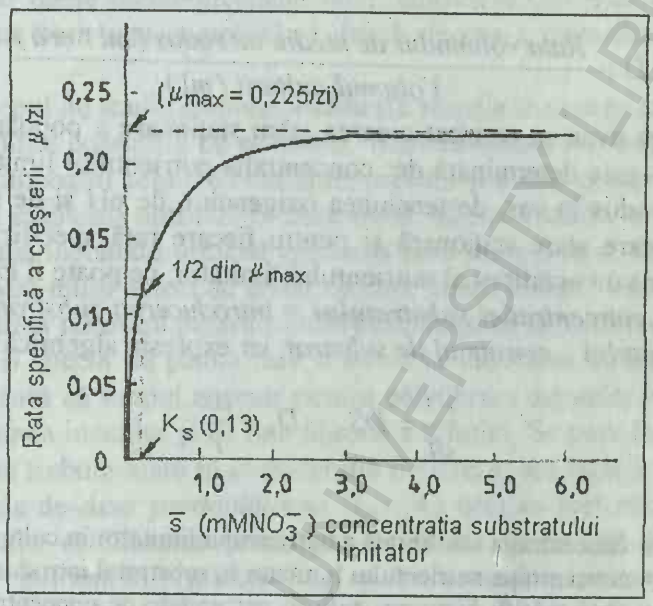


Fig. 62. Relaţia dintre μ (rata specifică a creşterii) şi S (concentraţia substratului limitator, din starea staţionară, în chemostat). Parametri: μ_{max} = 0,225/zi, K_s = 0,13 mM (NO_3) (după *King* şi colab., 1973)

Prin urmare, o stare staţionară poate fi realizată numai dacă rata specifică de creştere nu trece de μ_{max}. La o rată a diluţiei unde μ va trece de μ_{max}, creşterea devine neechilibrată.

În cultura de tip "batch", concentraţia nutrienţilor şi creşterea celulară poate să tindă spre zero. În chemostat, concentraţia substratului este menţinută prin adăugarea constantă de mediu proaspăt în sistem şi, în consecinţă, rata diviziunii celulare este fixată la un anumit nivel (fig. 62). În cadrul operaţiilor ce se efectuează în chemostat, rata diluţiei se fixează la o valoare corespunzătoare cu rata diviziunii celulare, rată ajustată – la rândul ei – pentru starea *staţionară* de evoluţie a celulelor aflate în cultură, în care densitatea celulară şi concentraţia substratului, rămân constante. Astfel, prin ajustarea ratei diluţiei la diferite stări staţionare, rata creşterii poate fi menţinută la o anumită valoare, pentru un anumit timp. Rata diluţiei (D) poate fi cuantificată cu ajutorul volumului de mediu care este introdus în vasul chemostatului:

În limitele biologice ale unei linii celulare, orice diluție a nutrientului

$$D = \frac{\textit{Rata volumului de mediu introdus (ml / oră)}}{\textit{Volumul culturii (ml)}}$$

limitator va avea ca rezultat crearea stării staționare a populației, care – la rândul ei – este determinată de: concentrația nutrientului limitator, din substratul introdus în vas, de tensiunea oxigenului, de pH și de alți parametri. Pentru fiecare stare staționară și pentru fiecare rată specifică de creștere, trebuie atins un echilibru al nutrientului limitator, ce poate fi exprimat astfel: ***echilibrul concentrației substratului*** = *introducerea substratului – scoaterea substratului – consumul de substrat*; iar expresia algebrică va fi:

$$\frac{ds}{dt} = DS_R - D_S - \frac{\mu x}{Y}$$

unde:

s = concentrația echilibrată a nutrientului limitator în cultură
S_R = concentrația nutrientului limitator în substratul introdus
μ = rata măririi biomasei culturii per unitate de concentrație a biomasei (rata specifică a creșterii)
x = număr de celule per unitate de volum și de timp (densitatea celulară) din starea staționară
D = numărul volumelor de cultură înlocuite prin substratul introdus per unitate de timp (rata diluției)
Y = coeficientul de producție – cantitatea de celule produsă per unitate de nutrient limitator consumat

Relația dintre concentrația nutrientului limitator (S_R) și densitatea celulară din starea staționară a culturii (x) a fost stabilită de *Monod* (1950) și constă din următoarea ecuație:

$$Y = \frac{x}{S_R - s}$$

În concluzie, modelul dat de *Monod* (1950) pentru creșterea microorganismelor se poate adapta foarte bine și pentru creșterea *in vitro* în mediu lichid, în sistemul chemostatului, a celulelor cormofitelor și permite definirea relației nutrienților cu ceilalți factori după cei trei termeni, și anume μ_{max}, K_s și Y.

Studiile efectuate asupra cineticii creșterii suspensiilor celulare vegetale în chemostat, indică o similitudine a evoluției culturilor, cu unele studii

efectuate cu microorganisme. Totuşi, deoarece populaţiile de celule sunt heterogene iar ratele metabolice sunt mici, cultivarea celulelor plantelor în chemostat este mult mai complexă şi diferă de cea a culturilor de microorganisme.

Termenul de stadiu staţionar defineşte situaţia în care în cultura celulară sunt stabilite condiţiile de echilibru. Acestea constau în atingerea unei densităţi şi compoziţii celulare constante, precum şi a unei compoziţii corespunzătoare a mediului nutritiv. În chemostat, aceste condiţii sunt realizate progresiv, după inoculare urmând ajustarea ratei diluţiei la o valoare potrivită şi fixă. Mai mulţi autori au arătat că unul dintre factorii importanţi care determină durata necesară pentru stabilirea condiţiilor de echilibru în sistem îl constituie şi specia de plantă care a servit la inducerea culturii celulare. Este evident însă că timpul necesar pentru echilibrare depinde, în mare măsură, de mărimea inoculului şi de rata iniţială a diluţiei. Se pare însă că, toate aceste aspecte trebuie luate în consideraţie deoarece, aşa cum s-a constatat, pentru celulele de *Acer psedoplatanus* (t_d = 43 ore) au fost necesare şapte generaţii pentru echilibrarea producţiei de celule (substanţă uscată) şi a concentraţiei nutrienţilor, printre care şi a factorului limitator (*Wilson*, 1976), iar pentru celulele de *Galium mollugo* (t_d = 25 ore) de opt generaţii (*Wilson* şi *Marron*, 1978).

Primele experimente efectuate cu suspensii celulare vegetale, cultivate în sistemul chemostat, au avut ca scop producerea de *biomasă*. Astfel, *Miller* şi colab. (1968) şi *Constabel* şi colab. (1971) au obţinut starea *staţionară* a creşterii într-un fitostat, la culturi celulare de *Glycine max* şi *Haplopappus gracilis*, prin adăugarea continuă în vas a mediului nutritiv proaspăt şi scoaterea automată a 10 ml de cultură, la intervale de 20 de minute. Producţia de biomasă celulară, în cazul descris, a fost de 1,34 mg substanţă uscată/ml, la un timp de generaţie de 46 ore. De asemenea, *Kurz* reuşea, în anul 1971, să crească în sistemul chemostat, suspensii celulare de *Glycine max* şi de *Triticum monococcum*, într-un fermentator cu mixare cu aer, la un timp de generaţie de 30 ore, obţinând o producţie celulară de 1,3 mg substanţă uscată/ml. În cazul culturilor celulare de *Mentha piperita*, crescute într-un bioreactor cu liftare de aer, la o rată a diluţiei de 0,27 l/zi, producţia de substanţă uscată realizată a fost de 14 g/l (*Chung* şi colab., 1994).

Dacă ne referim la coeficientul de producţie (Y), acesta redă valoarea creşterii celulare obţinute per unitate de substrat şi, de aceea, este importantă estimarea cantitativă a nutrienţilor necesari pentru cultură. În acest sens, se presupune că în stadiul *staţionar* al creşterii culturilor, cu substrat limitator al creşterii, valoarea minimă a substratului limitator, per celulă,

este compatibilă cu creşterea (*Wilson*, 1980). S-au calculat coeficienţii de producţie pentru mai multe culturi celulare, în care nutrientul limitator al creşterii era diferit. Astfel, *King* (1977) a găsit că, la culturile celulare de paltin (*Acer pseudoplatanus*), Y este de cca 0,34 g substanţă uscată/g de glucoză (în mediu cu glucoză, ca substrat limitator) şi de 0,45 g substanţă uscată/g de azotat (în care substratul limitator a fost NO_3^-). Rezultate similare au obţinut şi van *Gulik* şi colab. (1989), cu culturi celulare de *Catharantus roseus* crescute într-un chemostat modificat, în care nutrientul limitator al creşterii celulare a fost glucoza. Autorii au constatat că starea staţionară poate fi atinsă după cca 5 generaţii, iar coeficientul de producţie (Y), atins în acest stadiu, a fost de 0,35 g substanţă uscată/g de glucoză, la o rată a diluţiei de 0,0081 l/oră.

Cultura celulară cel mai des studiată în condiţiile chemostatului a fost *Acer pseudoplatanus*. *Wilson* şi colaboratorii (1970) au reuşit să menţină starea staţionară la o linie celulară iniţiată, din specia menţionată, pe o perioadă îndelungată de timp. În starea staţionară, în condiţiile de limitare a azotului, s-a reuşit stabilizarea nu numai a numărului constant de celule şi de substanţă celulară uscată, ci şi uniformitatea conţinutului ei în: proteine, ADN, ARN, glucoză, azotat şi fosfat, precum şi tensiunea oxigenului şi a valorilor de pH. Rezultate asemănătoare a obţinut şi *Wilson* (1976), prin utilizarea fosforului ca nutrient limitator al creşterii celulare. În aceste experimente, *Wilson* (1970 şi1976) a întrebuinţat, pentru cultivarea *in vitro* a celulelor de paltin, în sistem continuu, un fermentator foarte simplu ca şi construcţie, care poate funcţiona ca şi chemostat sau ca şi turbidostat (fig. 63). În principiu, aparatul este construit dintr-un vas principal (un vas *Erlenmeyer* de 3 litri, aşezat cu deschiderea în jos), în care se află amplasată suspensia celulară. Agitarea culturii se realizează prin pomparea unui curent de aer, iar nutrienţii (inclusiv nutrientul limitator al creşterii) se introduc în mod continuu în vasul de cultură. Menţinerea nivelului suspensiei celulare se realizează prin scoaterea, la intervale egale de timp, a unui anumit volum din suspensia celulară aflată în fermentator. Vasul principal al fermentatorului mai este prevăzut cu tuburi, pentru prelevarea de probe, precum şi cu o deschidere pentru evacuarea aerului. Trebuie să menţionăm însă faptul că, pentru funcţionarea normală a unui astfel de sistem sunt necesare o serie de instalaţii anexe, cum sunt: filtrele microbiologice pentru aer şi pentru mediul nutritiv, pompe electronice, pentru introducerea constantă a unui anumit volum de mediu proaspăt, precum şi pentru scoaterea constantă a unui anumit volum de suspensie, valvele solenoide etc.

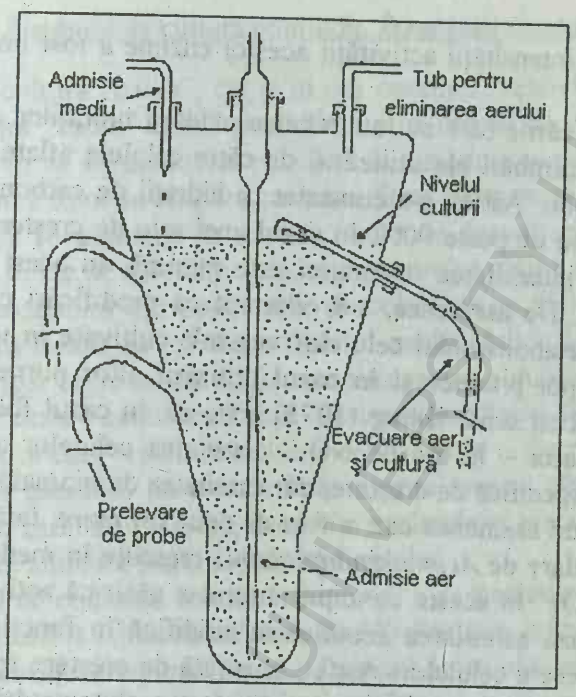


Fig. 63. Schema chemostatului (fitostatului) utilizat de *Wilson* (1976), pentru creşterea în sistem continuu a culturilor celulare de *Acer pseudoplatanus*

King şi *Street* (1973) au găsit că în culturile celulare de *Acer pseudoplatanus*, crescute în chemostat (în care azotul a fost agentul limitator al creşterii), mărirea ratei diluţiei a fost urmată de un declin rapid şi progresiv, al densităţii celulare a culturilor aflate în starea staţionară. Procesul indică nu numai efectul limitator al unui singur nutrient asupra ratei de creştere, ci şi punctele care se ating, pentru o valoare maximă a K_s, (de exemplu slaba afinitate a culturilor, pentru nutrientul limitator). Astfel, valoarea K_s pentru *Acer pseudoplatanus,* în condiţiile în care azotul a fost limitator al creşterii, a fost de 130 μM, iar în cazul în care fosforul a fost nutrientul limitator, valoarea K_s a atins nivelul de 32 μM. De asemenea, în suspensiile celulare de *Acer pseudoplatanus*, cultivate în chemostat, s-a remarcat faptul că, în condiţiile unei rate scăzute a creşterii celulare, activitatatea enzimelor din calea pentozofosfaţilor, respectiv activitatea fosfofructochinazei, a fost mult mai mare decât a celor din calea *Embden-Meyerhof-Parnas*, respectiv a glucozo-6-fosfatdehidrogenazei. În cazul în care rata creşterii celulare a fost

mare, situația intensității activității acestor enzime a fost inversă (*Flower* și *Clifton*, 1974).

Modificările care au loc în calea oxidării hidraților de carbon se reflectă și în schimbări ale utilizării, de către celulele aflate în suspensie, a sursei de carbon. Astfel, s-a constatat că hidrații de carbon sunt consumați într-o proporție de peste 90%, în cazul unei rate de creștere celulară intermediară, dar intensitatea respirației este minimă, în acest stadiu (*King* și *Street*, 1973). De asemenea, s-a observat că modificări considerabile ale creșterii și metabolismului celulelor vegetale cultivate *in vitro*, în sistemul continuu, se pot produce și în cazul utilizării altor nutrienți limitatori ai creșterii. În acest sens, *Young* (1973) arăta că, în cazul folosirii ureei – ca substrat limitator – în loc de NO_3^-, densitatea celulelor a fost mică la o anumită rată specifică de creștere, dar cantitatea de biomasă celulară uscată, obținută într-un asemenea caz, a fost de două ori mare, față de aceea a suspensiilor celulare de *Acer pseudoplatanus* crescute în medii cu un amestec de uree și NO_3^-. În aceste condiții, autorul a găsit că activitatea enzimelor care catalizează asimilarea azotului se modifică în funcție de schimbarea ratei de creștere a celulelor. Astfel, la o rată de creștere sporită, activitatea transaminazei se mărește, în timp ce activitatea glutamatdehidrogenazei și a nitratreductazei se micșorează.

5.5.2.2. Turbidostatul

Acest sistem poate fi utilizat în locul chemostatului, în cazurile în care culturile celulare sunt crescute la nivele mici ale densității celulare, iar rata specifică de creștere este aproape de/sau cât μ_{max}. Spre deosebire de chemostat (unde rata creșterii este determinată de substratul limitator), în turbidostat procesele sunt în totalitate reglate de către condițiile nutriționale, precum și de capacitățile metabolice ale celulelor vegetale.

Wilson și colaboratorii (1971) au descris un turbidostat pentru creșterea suspensiilor celulare vegetale. În acest sistem, densitatea celulară a fost monitorizată cu ajutorul unui detector fotoelectric de densitate. Acesta este atașat la un sistem de control, care reglează introducerea de mediu proaspăt în sistem, volumul culturii și scoaterea de celule și de mediu din turbidostat, permițînd astfel ca densitatea populației celulare să fie menținută la o valoare predeterminată.

5.5.2.3. Sistemul de cultură continuu, fazat (sau sincron)

Atât în cultura "batch", cât şi în cea continuă, celulele se divid randomic. În cultura "batch" există posibilitatea ca timpul de dublare a generaţiilor succesive să se modifice, pe când în sistemul continuu el rămâne constant. Într-un sistem de creştere continuu fazat (sincronizat), ideal ar fi ca toate celulele să se găsească în acelaşi stadiu de dezvoltare a ciclului lor celular. Astfel, în loc de o condiţie medie, aşa cum se obţine ea în starea staţionară a chemostatului din populaţiile de celule ce se divid randomic, în cultura continuu fazată, ar exista un tipar al modificărilor care coincide cu ciclul celular, tipar ce se repetă cu fiecare succesiune a dublării populaţiilor. În acest mod, celula - amplificată prin mărimea populaţiei fazate - va putea fi examinată în oricare stadiu al ciclului celular şi la orice rată de creştere. Acest aspect ar constitui un extraordinar avantaj pentru obţinerea compuşilor vegetali în cantităţi maxime, deoarece enzimele şi metaboliţii sunt sintetizaţi numai în anumite stadii ale ciclului celular.

Metoda de cultivare continuă sincronă, a suspensiilor celulare vegetale, a fost aplicată la culturile celulare de *Glycine max*, aflate în starea *staţionară*, prin introducerea unui flux de azot sau de etilenă, compuşi aflaţi în stare gazoasă, la intervale regulate de timp, în vasul unui chemostat (*Constabel* şi colab.,1974 şi 1977). Condiţiile de anaerobioză, impuse temporar (90 min/24 ore), nu au exercitat efecte negative asupra culturii, iar cantitatea de biomasă celulară, uscată, a rămas destul de constantă şi după 5 săptămâni de la aplicarea tratamentului. Indexul mitotic al culturilor celulare de soia, crescute în chemostat, şi continuu aerate, s-a menţinut în jur de 5%. Tratamentul cu azot, timp de 90 min/zi, a condus la o scădere puternică a indexului mitotic. După 8 ore de la reînceperea aeraţiei normale, celulele au început din nou să se dividă, cu o frecvenţă sporită. Indexul mitotic, urmând un ciclu de 24 de ore, a atins valoarea maximă înainte de reînceperea tratamentului cu azot. Atunci când N_2 nu a mai fost administrat, iar cultura a fost aerată fără întrerupere, ciclul celular (de 24 de ore) a continuat timp de 4 zile. Dacă durata intervalelor dintre tratamentele cu N_2 a fost de 30 de ore, populaţiile au reacţionat printr-o prelungire a ciclului lor celular de la 24, la 30 de ore şi printr-o creştere a amplitudinii acestuia. Sincronizarea parţială a culturilor celulare a fost puternic ameliorată prin tratarea acestora cu 3% etilenă, timp de trei ore, urmată imediat de o barbotare a lor cu CO_2 (3%), timp de trei ore şi, apoi, de o aerare a culturilor, timp de 30 de ore, înainte de aplicarea următorului tratament, cu etilenă. Această succesiune de trata-

mente a făcut ca amplitudinea ciclului celular să mărească indexul mitotic de la 0,5 - 2% (minim), la 15 - 20% (maxim).

Posibilitatea de sincronizare a populațiilor de celule vegetale, aflate în cultură, va facilita investigațiile moleculare efectuate asupra proceselor metabolice şi fiziologice care au loc pe durata ciclului celular şi a mecanismelor ce guvernează mitoza. În plus, populațiile celulare vor putea fi studiate şi din punct de vedere al competiției existente între celule, pentru absorbția şi integrarea informației genetice străine şi a compatibilității nucleilor, în heterocarioni.

5.6. CULTIVAREA PE SCARĂ LARGĂ A CELULELOR VEGETALE

Cultivarea *in vitro*, pe scară largă (sau în masă), a celulelor cormofitelor, poate fi definită ca un sistem de creştere a celulelor vegetale în recipiente cu o configurație, mod de funcționare şi volum, total diferite de cel al vaselor de tip Erlenmeyer (vase în care mixarea şi aerarea suspensiilor celulare se realizează prin menținerea lor pe agitatoare de diverse tipuri, aşa cum sunt agitatoarele rotative orizontale). Astfel de sisteme poartă denumirea de bioreactoare sau fermentatoare, iar volumul de lucru al acestora depăşeşte 20 de litri.

După *Scragg* (1991 b) creşterea celulelor în bioreactoare prezintă două mari avantaje:

- în primul rând, bioreactoarele oferă posibilitatea unui control şi a unei monitorizări a condițiilor de cultură. Astfel, pot fi controlați, ajustați şi menținuți, la un anumit nivel, o serie de parametri: pH-ul mediului şi componentele gazoase (O_2, CO_2,) dizolvate sau a celor care intră şi ies din interiorul vasului bioreactorului. În plus, bioreactorul oferă posibilitatea unei mixări şi aerări optime a culturii celulare, precum şi prelevarea probelor de cultură din vas, în orice moment;

- în al doilea rând, creşterea suspensiilor de celule vegetale în bioreactoare, poate să aducă informații prețioase pentru trecerea la cultivarea celulelor pe scară largă, în scopul punerii la punct a detaliilor necesare în procese de mai mare amploare, la nivel industrial.

Cultivarea *in vitro*, pe scară largă, a celulelor vegetale este privită ca o alternativă pentru obținerea principiilor farmacologic active, compuşi care în mod normal, sunt extraşi din plantele intacte. În prezent, sunt cultivate *in vitro*, cu succes (la nivel industrial), în bioreactoare de peste 500 de litri, câteva specii: *Lithospermum erythrorhizon* (şiconine), *Nicotiana tabacum*

(nicotină) *Coptis japonica* şi *Thalictrum minus* (alcaloizi berberinici), *Morinda citrifolia* (antrachinone), *Coleus blumei* (acid rozmarinic) şi *Aralia cordata* (antociani) (*Ritterhaus* şi colab., 1990). Deşi condiţiile necesare pentru creşterea celulelor şi pentru producerea compuşilor secundari de metabolism, în vase Erlenmeyer, în medii agitate, pot fi optimizate, totuşi, în bioreactoare, astfel de optimizări nu pot fi aplicate, deoarece în aceste sisteme se modifică mai mulţi parametri (parametri care vor trebui din nou determinaţi, pentru a se putea trece la o cultură practicată pe scară largă). Pentru ca un bioreactor să funcţioneze în condiţii optime, el trebuie să deţină câteva proprietăţi esenţiale, şi anume:

- să asigure, pe întreaga perioadă de cultură, sterilitatea mediului;
- să asigure accesul pieselor necesare pentru reglarea şi măsurarea pH-lui, a temperaturii, a oxigenului şi altor gaze dizolvate şi nedizolvate în mediul de cultură;
- să permită prelevarea de probe;
- să permită aerarea culturii;
- să fie prevăzut cu echipamente pentru mixarea culturii.

5.6.1. Tipuri de bioreactoare

Cultivarea pe scară largă a celulelor vegetale datează încă din anul 1959, an în care *Tulecke* şi *Nickel* au reuşit să crească pentru prima dată, într-un bioreactor (de tip sistem închis), suspensii celulare induse din diferite specii (*Nicotiana, Ginkgo, Lolium* şi *Rosa*). Acest aparat a fost unul dintre cele mai simple sisteme realizate la acea dată, fiind alcătuit dintr-un balon de sticlă de 20 de litri, închis cu un dop de cauciuc prin care treceau 4 tuburi utilizate pentru: 1) admisia aerului; 2) evacuarea aerului şi a gazelor rezultate în urma procesului de fermentaţie/respiraţie; 3) pentru introducerea mediului nutritiv şi 4) pentru inoculare şi pentru recoltarea de probe. În acest sistem, atât mixarea, cât şi aerarea culturilor celulare este realizată prin barbotare cu aer (fig. 64).

Dacă la început, vasele utilizate pentru creşterea celulelor erau confecţionate din sticlă, ca urmare a avansului biotehnologic, precum şi a cererii crescute de biomasă vegetală bogată în principii biologic active, utilă industriei farmaceutice, s-a mărit şi volumul de lucru a acestora. Din acest motiv, majoritatea vaselor au fost construite din oţel inoxidabil.

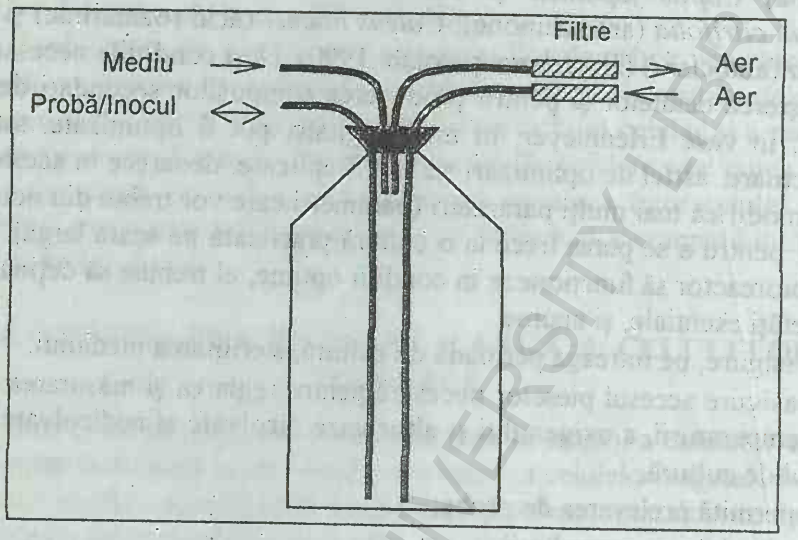


Fig. 64. Schema primului tip de bioreactor utilizat de către *Tulecke* şi *Nickel* în 1959 pentru creşterea *in vitro* a celulelor vegetale

Deşi tehnologia de construcţie a bioreactoarelor s-a perfecţionat încontinuu, funcţionarea lor fiind dirijată astăzi de computere, totuşi, şi în prezent, pot fi distinse trei mari categorii de fermentatoare care au fost descrise, mai mult sau mai puţin detaliat, de mai mulţi autori (*Wagner* şi *Vogleman*, 1977; *Martin*, 1980a; *Flower*, 1982; *Scragg* şi *Flower*, 1985; *Tanaka*, 1987; *Kreis* şi *Reinhard*, 1989). Astfel de bioreactoare (fig. 65), a căror rezervoare au o capacitate de peste 500 litri, sunt citate în literatura de specialitate, în funcţie de tipul de mixare/agitare, sub denumirea de:

a) *stirred-tanks* (engl) - bioreactoare în care agitarea culturilor este mixtă, fiind realizată prin intermediul unui rotor cu palete şi a aerului introdus sub presiune. În acest tip de bioreactoare, viteza de rotaţie a rotorului cu palete (turbinei sau impulsorului - impeller) este mică (50 - 100 rpm), în scopul scăderii la maximum a stresului hidrodinamic (sau stresul de forfecare) (fig. 65 A);

b) *buble-tanks* (engl) - bioreactoare cu barbotare, în care mixarea culturilor se realizează numai cu ajutorul aerului introdus în vase, sub presiune. Ele sunt denumite şi bioreactoare cu liftare de aer (Engl = air-lift) (fig. 65 B). În ele nu se mai nasc acele forţe de forfecare, observate în fermentatoarele prevăzute turbine. Bioreactoarele de acest tip pot fi construite în două moduri, şi anume:

- un vas principal (cilindric), în interiorul căruia se află un cilindru concentric, la baza căruia se află dispozitivul de dispersie a fluxului de aer (fig. 65 B, stânga);
- un vas principal (cilindric) prevăzut cu un tub lateral, în care fluxul de aer este introdus fie printr-un tub exterior, fie prin cel lateral (fig. 65 B, dreapta).

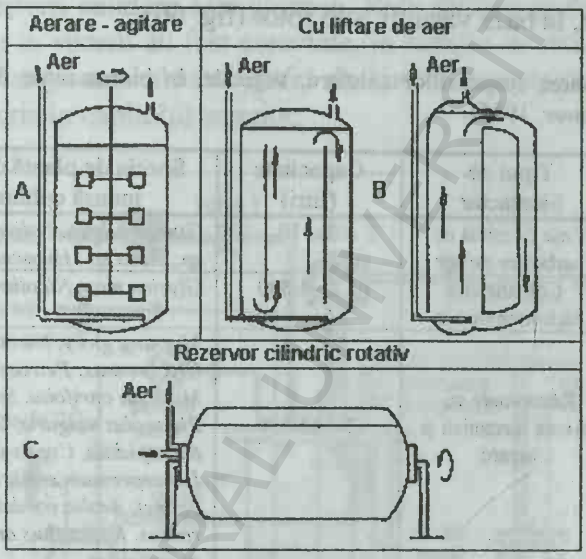


Fig. 65. Tipuri de bioreactoare în care mixarea/aerarea culturilor celulare este asigurată de: A - de un rotor cu palete şi prin aerare (stirred-tanks); B – prin liftarea aerului (air-lift); C – prin rotirea vasului de cultură şi aerare de tip cilindric (rotating drum) (după *Kreis* şi *Reinhard*, 1989)

c) *rotating drum* (engl) – cel de al treilea tip de bioreactor, a fost realizat în urmă cu cca 17 ani. Vasul de cultură, rotativ, este orizontal, iar tuburile utilizate pentru introducerea şi eliminarea aerului sunt plasate lateral (fig. 65 C). Nici în acest tip de bioreactor, nu se mai întâlnesc forţele de forfecare.

În tabelul 15 sunt prezentate principalele modele de bioreactoare şi suspensiile celulare crescute în ele.

Pentru o mai bună înţelegere a alcătuirii unui sistem de cultivare în masă a celulelor vegetale, vom reda mai jos, schiţa şi modul de funcţionare, pe scurt, a două tipuri de bioreactoare.

Primul tip de bioreactor pe care îl descriem este cel cu mixare mecanică şi cu aerare. Capacitatea vasului sau a rezervorului în care cresc suspensiile celulare, în acest caz cele de *Catharanthus roseus*, a fost de 3 litri (*van Galik* şi colab., 1989). Mixarea culturilor s-a realizat cu ajutorul unei turbine, prevăzute cu două şiruri de palete (6 pe un şir), activată de un motor, la o viteză de 125 rpm. Aerarea a fost asigurată la o rată de 30 l/oră, cu ajutorul unui dispozitiv de dispersie a aerului, fabricat din sticlă poroasă şi aşezat în interior, la baza vasului, sub rotor (fig. 66).

Tabelul 15. Cultivarea suspensiilor celulare, vegetale, în bioreactoare de diferite tipuri (după *Scragg* şi *Flower*, 1985)

Anul	Tipul de bioreactor	Capacitate (litri)	Specia de plantă din care a fost indusă cultura celulară
1959 - 1975	Vase de sticlă cu barbotare de aer	3 – 10	*Ginkgo biloba, Lolium sp., Mentha sp., Rosa sp., Hyosciamus niger*
1971-1975	Coloane cu barbotare de aer	1,8 - 1.500	*Glycine max, Nicotiana tabacum*
1971- prezent	Rezervoare cu mixare mecanică şi aerare	2 – 15.500	*Morning glory, Nicotiana tabacum, Glycine max, Petroselinum arvense, Morinda citrifolia, Spinacia oleracea, Phaseolus vulgaris, Cudriana tricuspidata, Coptis japonica, Lithospermum erythrorhizon, Coleus blumei, Aralia cordata, Catharanthus roseus, Helianthus annuus, Picrasma quassioides*
1977- prezent	Liftare de aer	7 – 100	*Morinda citrifolia, Catharathus roseus, Theobroma cacao, Cudriana tricuspidata, Berberis Wilsoniae, Cinchona ledgeriana*
1983 - pezent	Cilindru rotativ	4 – 100	*Catharanthus roseus*

Influxul de aer a fost pre-uscat, prin trecerea lui printr-un filtru cu vată hidrofobă şi apoi, tot printr-un filtru hidrofob, cu pori de 0,2 μ. Cantitatea de aer care intră în interiorul vasului se menţine la un nivel constant, cu ajutorul unui sistem de contorizare. Aerul care iese din reactor, trece printr-un condensator (menţinut la o temperatură de 4°C prin intermediul unui criostat), iar cantitatea de apă care se pierde prin evaporare, respectiv cea care se adună în condensator, este cuantificată. Temperatura culturii a fost păstrată la 25°C, prin intermediul apei termostatate care circulă în jurul rezervorului; pH-ul culturii a fost reglat permanent, la valoarea de 5,0 cu NaOH 1 N (cu un sistem automat de control, prevăzut cu electrozi sterilizabili). Mediul proaspăt este adăugat continuu în vasul de cultură, cu ajuto-

rul unei pompe peristaltice (dintr-un rezervor cu mediu proaspăt), iar cultura celulară este scoasă afară din vas, în mod intermitent, de sub suprafața mediului lichid, cu ajutorul unei instalații speciale și este deversată într-un vas de recoltare. În acest mod, se menține un nivel constant al volumului culturii. Aparatul mai este echipat și cu valve solenoide, care se închid și se deschid automat. Acest tip de bioreactor, construit inițial pentru cultura de tip "batch", a fost adaptat pentru cultura de tip continuu, în care nutrientul limitator al creșterii celulare este glucoza. Rata diluției și concentrația glucozei introduse în sistem au fost corectate, în funcție de rata de evaporație. Principiul de funcționare al unui astfel de sistem deschis de cultură continuu, a fost descris în capitolul anterior.

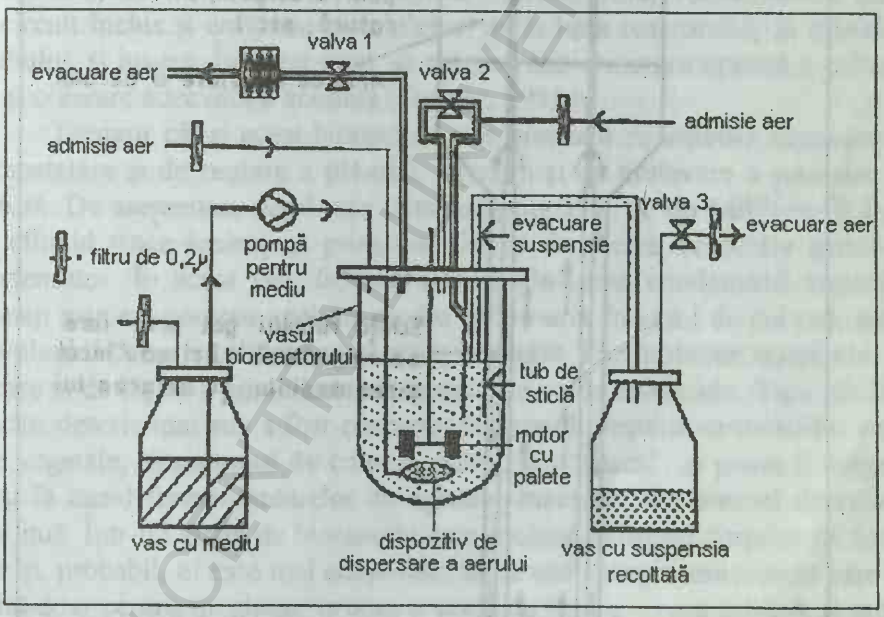


Fig. 66. Reprezentarea schematică a unui bioreactor cu mixare dublă: rotor cu palete și aerare; bioreactor în care suspensiile celulare vegetale sunt crescute într-un sistem de cultură continuă deschisă (după *van Galik* și colab., 1989)

Desigur, tipul de impulsor care este utilizat pentru mixarea culturilor celulare, din interiorul rezervoarelor bioreactoarelor, poate să difere. Astfel, se folosesc rotoare (impusoare) prevăzute cu palete verticale și plate, verticale plate și sub formă de grilă, sau cu palete asemănătoare celor de la elicea vapoarelor, ori cele de tip spirală.

Al doilea tip descris în acest capitol, este bioreactorul cu liftare de aer (fig. 67), bioreactor care este prevăzut cu un cilindru interior, concentric, şi a cărui schemă de funcţionare a fost redată şi în figura 65B (stânga).

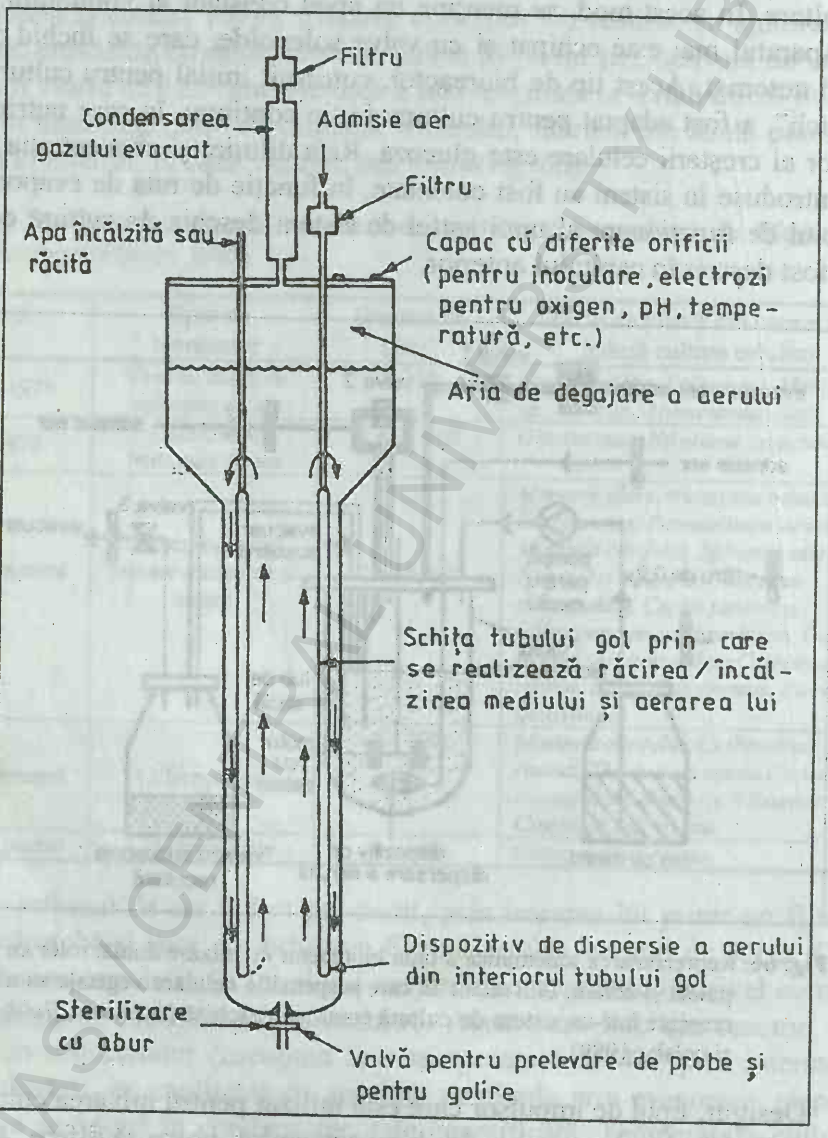


Fig. 67. Schema unui bioreactor cu liftare de aer (după *Scragg*, 1991 b)

În general, aşa cum am mai arătat, se utilizează două variante de bioreactoare cu liftare de aer (vezi figura 65). Prima variantă este cea la care în rezervorul principal este montat un cilindru interior, concentric (fig. 65B

stânga). La varianta a doua, vasul principal este prevăzut cu un tub lateral (vezi figura 65B dreapta). Trăsătura comună celor două variante, constă în faptul că atât mixarea, cât şi aerarea se asigură prin pomparea unui flux de aer la baza vasului fermentatorului, flux care va antrena în mişcarea sa ascensională celulele vegetale aflate sub formă de suspensie.

În cazul primei variante (vezi figura 65B stânga, şi figura 67), aerul este pompat la baza vasului, fluxul de aer fiind dispersat în bule fine care sunt orientate către partea dinăuntru a cilindrului intern. Bulele circulă în continuare, prin interiorul cilindrului spre partea lui superioară, antrenând – în ascensiunea lor – celulele vegetale şi mediul, până la suprafaţa culturii, pentru ca apoi acestea să se reîntoarcă spre baza vasului, prin spaţiul dintre pereţii cilindrului intern şi cei ai vasului bioreactorului, realizându-se astfel un circuit închis şi continuu al celulelor, de la baza reactorului, la suprafaţa mediului, şi invers. În acest mod, se asigură atât o mixare optimă a culturii, cât şi o aerare adecvată a acesteia (*Scragg*, 1991 b).

Desigur că, şi acest bioreactor este prevăzut cu sisteme automate de termostatare şi de reglare a pH-ului, precum şi de prelevare a probelor de cultură. De asemenea, aerul este introdus prin filtre de tip Millipor (0,2 μ), iar efluxul trece înainte şi printr-un sistem de răcire, respectiv printr-un condensator. În acest caz, lichidul rezultat în urma condensării vaporilor formaţi prin evaporarea apei din mediu se întoarce în vasul de cultură, astfel că volumul culturii celulare va rămâne constant. Funcţionarea sistemelor de intrare şi de ieşire a aerului este asigurată de valve solenoide. Tipul de bioreactor descris mai sus a fost conceput în scopul creşterii suspensiilor celulare vegetale, în sistemul de cultură închis, sau "batch", şi poate fi adaptat, ca şi în cazul fermentatoarelor cu agitator mecanic, la sistemul de cultură continuă. Într-un astfel de bioreactor este exclusă existenţa forţelor de forfecare şi, probabil, el este mai economic, deoarece energia consumată este folosită doar pentru un singur proces – acela de aerare – care asigură şi mixarea culturii celulare.

Aşa cum arătam mai sus, unul dintre tipurile de bioreactoare construite mai recent este şi cel cu rezervor cilindric, orizontal, rotativ (vezi fig. 65C). Acest tip de bioreactor a fost utilizat pentru creşterea culturilor celulare de *Catharanthus roseus*, în rezervoare cu volume cuprinse între 100 şi 1000 de litri (*Tanaka* şi colab., 1983).

Construcţia unui alt tip de bioreactor s-a bazat pe fluxul *Taylor-Couette*, mixarea culturii fiind asigurată de vârtejul format între doi cindri concentrici, care se rotesc în sensuri opuse, cu o viteză de 200 rpm. Un

astfel de bioreactor, cu capacitatea de 2,5 litri, a fost întrebuințat, cu succes, în creşterea culturilor celulare de *Beta vulgaris* (după *Scragg*, 1991 b).

Într-un alt tip de bioreactor, pentru dispersia oxigenului în interiorul vasului, s-au utilizat membrane hidrofobe alcătuite din fibre de polipropilen poros, goale în interior. Aerul este trecut trece prin aceste membrane şi este dispersat foarte fin, astfel că oxigenul difuzează cu uşurință în interiorul mediului de cultură. Mixarea culturii s-a realizat cu ajutorul unui agitator magnetic. Într-un astfel de bioreactor, de 21 litri, s-a reuşit creşterea suspensiilor celulare de *Thalictrum rugosum*, cu o producție de biomasă celulară, uscată, de 50 g/l (*Facchini* şi *DiCosmo*, 1991 a).

În ceea ce priveşte capacitatea bioreactoarelor, aceasta a crescut rapid, începând cu anul 1972. Astfel, *Kato* şi colab. (1972), în scopul cultivării celulelor de tutun în medii lichide, au folosit, la început, un fermentator de 15 litri, pentru ca, apoi, tot pentru aceeaşi specie, ei să utilizeze vase de 20 şi 230 de litri (*Kato* şi colab., 1977). În anul 1974, *Hahlbrock* a demonstrat posibilitatea creşterii culturilor celulare de *Glycine max* şi de *Petroselinum sp.* în volume de 300 de litri, folosind un rezervor cu agitare mecanică (stirred-tank bioreactor), iar *Noguchi* şi colaboratorii (1977) au reuşit să cultive suspensiile celulare de *Nicotiana tabacum* în acelaşi tip de bioreactor, având însă o capacitate de 20.000 de litri (15.500 litri volumul de lucru).

Începând cu anul 1977, a fost pusă la punct şi construcția bioreactoarelor cu liftare de aer. Astfel, *Wagner* şi *Vogleman* (1977) au reuşit să crească, în acest tip de bioreactor (capacitate – 10 litri), suspensii celulare de *Morinda citrifolia*. De asemenea, *Flower* a cultivat, în anul 1981, suspensii celulare de *Catharanthus roseus*, într-un astfel de bioreactor cu liftare de aer, cu o capacitate de 100 de litri.

5.6.2. Factori care pot influența cultivarea pe scară largă a celulelor vegetale

5.6.2.1. Mixarea

O caracteristică esențială pe care trebuie să o dețină oricare sistem de cultură în masă a celulelor vegetale este mixarea şi aerarea adecvată a celulelor, în scopul creării condițiilor de omogenitate în interiorul bioreactorului.

Aşa cum am mai arătat, celulele plantelor diferă de cele ale microorganismelor printr-o serie de particularități, care influențează – în mod fundamental – cultivarea lor *in vitro*, indiferent de sistemul în care acestea sunt crescute (tabelul16). Astfel, în suspensiile de celule vegetale se întâl-

nesc rar celule autonome, deoarece ele aderă una de alta în mod curent, formând grupuri sau agregate alcătuite din câte 2 până la 10 celule.

Prezența acestor agregate crează două probleme, şi anume: a) în primul rând, metodele turbidometrice de estimare a numărului de celule, sunt impracticabile; b) în al doilea rând, agregatele celulare vor produce dereglări în mixarea şi reologia culturilor celulare, dereglări care vor depinde de numărul de celule per agregat, de morfologia agregatelor şi de numărul agregatelor per unitate de volum, de cultură. Formarea acestor grupuri de celule poate fi influențată de compoziția mediului de cultură, de metoda de subcultivare, sau de condițiile de mediu (lumină, temperatură etc.). Modificarea unor astfel de condiții poate să conducă la apariția unor agregate mari, de peste 2 mm în diametru, care dețin peste 200 de celule per agregat. Un alt factor care poate induce agregarea celulelor este creşterea "adezivității" lor, datorită învelişului polizaharidic, extracelular, al acestora. În unele cazuri, se citează posibilitatea reducerii agregării celulelor, prin introducerea în mediu a unui volum suplimentar de CO_2, care va reduce nivelul polizaharidelor extracelulare (*Scragg* şi *Flower*, 1985).

Datorită mărimii şi a peretelui lor celular, celulele plantelor cultivate în bioreactoare cu agitare mecanică sunt supuse forțelor hidrodinamice, sau aşa numitelor "forțe de forfecare", care au ca efect tăierea, deci distrugerea lor, atât în fermentatoarele cu volum mic, cât şi în cele cu volume mari. *Wagner* şi *Vogleman* (1977) au arătat că în urma mixării culturii cu rotoare cu palete, celulele de *Morinda citrifolia* sunt lezate, iar producția de metaboliți secundari (antrachinone) scade cu peste 60%. Aceste celule devin mai sensibile la stresul de forfecare, spre sfârşitul fazei de creştere a culturilor. Şi alte culturi celulare, ca cele de *Nicotiana tabacum* şi de *Daucus carota*, s-au dovedit a fi sensibile la acțiunea forțelor hidrodinamice (*Flower*, 1982). Totuşi, mai recent, *Meijer* şi colaboratorii (1994) au găsit că există celule rezistente la acțiunea acestui agent de stres. Astfel, dintre liniile celulare de *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum*, *Cinchona robusta* şi *Tabernaemontana divaricata*, cultivate în bioreactoare cu agitatoare mecanice, doar liniile de *C. roseus* şi de *N.tabacum* au fost capabile să crească în condițiile unui stres hidrodinamic foarte mare. Autorii menționați au presupus că aceste diferențe, în ceea ce priveşte sensibilitatea celulelor vegetale cultivate *in vitro*, față de stresul de forfecare, care depind – în principal – de linia celulară utilizată, nu pot fi încă explicate. Aceiaşi autori au presupus că rezistența, sau sensibilitatea celulelor, poate fi influențată de o combinație de factori, cum sunt: specia, regimul de subcultivare şi condițiile de creştere.

Tabelul 16. Diferențele morfofiziologice dintre celulele cormofitelor și cele ale microorganismelor (după *Scragg* și *Flower*, 1985; *Scragg*, 1991 b)

Caracteristici	Celulele microorganismelor	Celulele cormofitelor cultivate *in vitro*	Efectul caracteristicilor asupra cultivării *in vitro* a celulelor vegetale
Mărime	2 μm^3	$>10^5$ μm^3	Sensibilitate la forfecare; sedimentare rapidă
Celule individuale	Adesea	În general, acestea cresc sub formă de agregate	Sedimentare rapidă; posibilitatea creării micromediului; vâscozitate mică
Creșterea celulelor sub formă de colonii	Permanent	Sporadic	Scăderea posibilității de a selecta sușe celulare
Timpul de dublare (rata creșterii)	Rapid (1 oră)	Scăzut (zile)	Mărirea intervalului de subcultivare și micșorarea posibilității de menținere a sterilității
Densitatea inoculului	Mică	5 – 20%	Sunt necesare cantități mari de inocul per vas
Stresul de forfecare	Insensibile	Sensibile	Viteză mică a agitatorului
Aerarea	Mare 1–2 vol/vol/min	Mică 0,2–0,3 vol/vol/min	O aerare scăzută necesită o valoare a K_La adecvată
Variabilitatea	Stabile	Pot varia puternic	Caracteristicile culturii nu sunt stabile; pot fi necesare slecții continue
Numărul de cromozomi	Haploide/diploide	Mixtură de haploide, diplode, poliploide și aneuploide	Cultura își poate modifica caracteristicile în funcție de populația dominantă
Formarea produșilor	Adesea eliminați în mediu	În interiorul vacuolei	Este necesară recoltarea celulelor și nu extracția continuă a produșilor din mediu

Dacă studiile cu privire la influența exercitată de stresul hidrodinamic asupra celulelor cultivate sub formă de suspensii sunt relativ avansate, se cunosc mult mai puține aspecte cu privire la reologia culturilor celulare și implicațiile ei în mixare. Ceea ce se cunoaște cu certitudine, este faptul că vâscozitatea suspensiilor celulare vegetale se mărește o dată cu creșterea celulară (*Kato* și colab., 1978). De asemenea, se consideră că la o densitate celulară mare (≥ 20 g substanță uscată/l) cultura devine vâscoasă, proces care poate afecta creșterea celulelor vegetale, în special în bioreactoarele cu liftare de aer. În general, se presupune că, suspensiile celulare vegetale au un comportament reologic complex și că ele pot prezenta un comportament ne-*Newtonian*, de tip *Bingham*.

Comportamentul reologic a fost determinat pentru mai multe tipuri de culturi de celule vegetale. S-a găsit astfel, că suspensiile celulare de *Morinda citrifolia* sunt sensibile la forfecare și au un comportament reologic tixotropic, la o concentrație de 20 g substanță uscată/l, în timp ce suspensiile celulare de *Cudrania tricuspidata*, *Vinca rosea* și de *Agrostemma githago*

au un comportament pseudoplastic, la o producție de 10 – 18 g de substanță uscată/l (*Tanaka*, 1987).

Rezultatele obținute de către *Curtis* și *Emery* (1993), în urma măsurătorilor reologice efectuate asupra a 10 tipuri de culturi de suspensii celulare, vegetale, au scos în evidență câteva aspecte. Astfel, culturile celulare de *Nicotiana tabacum*, crescute în sistemul "batch", se caracterizează printr-o vâscozitate mare și o reologie de tip *Bingham*. Această reologie, nedorită, este rezultatul alungirii celulelor. În schimb, suspensiile celulare de *Papaver somniferum*, crescute tot în sistemul "batch", prezintă un comportament reologic asemănător fluidelor de tip *Newtonian*; ele se carcaterizează printr-o vâscozitate mică, chiar la o densitate celulară (exprimată în substanță proaspătă) de 250 g/l. Acest comportament reologic a fost atribuit, de către cei doi autori menționați mai sus, absenței celulelor alungite din cultura de suspensii celulare de mac. *Curtis* și *Emery* (1993) afirmau că vâscozitatea mare nu este o caracteristică intrinsecă a suspensiilor celulare vegetale, ci mai degrabă ea se datorează capacității acestora de a crește la densități extrem de mari, deoarece cerințele lor pentru oxigen sunt foarte reduse. De asemenea, cei doi autori citați anterior au arătat că datorită corelației dintre vâscozitate, densitatea celulelor vegetale și conținutul lor în apă, suspensiile celulare, la o aceeași vâscozitate aparentă, ar putea deține densități, exprimate în substanță uscată, foarte diferite. Posibilitatea de a reduce conținutul celular în apă, prin adaptarea presiunii osmotice a mediului la nivele corespunzătoare, ar putea avea ca efect mărirea productivității volumetrice a substanței uscate în bioreactoare, prin atenuarea problemelor asociate de vâscozitatea mare a suspensiilor celulare vegetale.

În aceste studii, proprietățile reologice ale culturilor celulare vegetale au fost măsurate cu diferite sisteme și tipuri de vâscozimetre. Totuși, multe din rezultatele obținute sunt incerte, și până când nu vor exista date suficiente, va fi foarte greu, dacă nu imposibil, să se determine cu certitudine, dacă culturile celulare vegetale au un comportament de tip *Bingham* sau pseudoplastic. Se pare însă că această vâscozitate nu ridică probleme prea mari în cazul celulelor vegetale cultivate pe scară largă, unde mai importante sunt mixarea și aerarea, deoarece s-a reușit creșterea suspensiilor celulare la densități celulare foarte mari, utilizându-se bioreactoare cu o configurație a agitatorului și a sistemului de aerare mai specială. Ca exemple, menționăm culturile celulare de *Oryza sativa*, cu o producție de 30 g biomasă celulară uscată/l (*Yokoi* și colab., 1993), sau cele de *Thalictrum rugosum*, unde cantitatea de substanță uscată atinge nivelul de 50 g/l (*Scragg*, 1991 b).

5.6.2.2. Aerarea

Deşi celulele cormofitelor cultivate *in vitro* sunt relativ mari, o mare parte din volumul lor este ocupat de vacuola centrală, care conţine peste 90% apă, astfel că citoplasma este prezentă doar într-o proporţie foarte mică. De asemenea, în vacuolă sunt stocaţi o serie de metaboliţi care, în mod normal, nu sunt excretaţi în mediul extern, spre deosebire de culturile de microorganisme. Aceste caracteristici se reflectă şi asupra actvităţii lor metabolice, activitate care este scăzută şi care, împreună cu rata mică de creştere, fac ca necesarul de oxigen al celulelor vegetale cultivate în suspensii să fie extrem de redus (1 – 3 mM O_2/g/oră), în comparaţie cu cel al microorganismelor (10 – 100 mM O_2/g/oră).

Se poate spune că, oxigenul este mai degrabă insolubil în apă (valoarea lui de saturaţie în apă este de 7 ppm la 25°C) şi, de aceea, el poate deveni un factor limitator al creşterii pentru microorganisme. În cazul culturilor celulare vegetale, se pare că mai importantă este mixarea, decât aerarea. În mod normal, aerul este dispersat în mediul de cultură sub formă de bule, la baza vasului bioreactorului. Volumul bulelor de aer, sau al celor ce conţin amestecuri de oxigen şi dioxid de carbon, poate fi micşorat prin spargerea lor de către paletele rotorului, la fermentatoarele cu mixare mecanică. Pentru a fi transferat în celule, oxigenul trebuie întâi să se dizolve în mediu. Rata transferului oxigenului poate fi afectată de o serie de factori, aşa cum sunt: rezistenţa peliculei de gaz de la suprafaţa bulei, rezistenţa interfaţei gaz-lichid, rezistenţa peliculei de lichid dintre interfază şi volumul lichidului, rezistenţa fazei lichide faţă de transferul oxigenului din lichid, la pelicula din jurul celulei, rezistenţa peliculei de lichid, rezistenţa intercelulară sau intra-agregate şi rezistenţa datorită consumului de oxigen de către celule. Suma tuturor acestor tipuri de rezistenţe depinde atât de compoziţia mediului de cultură, cât şi de densitatea celulară şi de intensitatea activităţii metabolice a celulelor (*Scragg*, 1991).

Rezistenţa principală este dată de pelicula lichidă care înconjoară bulele de gaz şi, astfel, coeficientul transferului total de oxigen (K_L) este foarte asemănător cu coeficientul de transfer al peliculei de lichid. Rata volumetrică de absorbţie a oxigenului (OUR) poate fi definită, după *Scragg* (1991 b), astfel:

$$OUR = K_L a\,(C^* - C_L)$$

unde C^* este concentraţia echilibrată a oxigenului dizolvat (mM), C_L este concentraţia oxigenului în mediul lichid (mM), K_L este coeficientul de

transfer al masei părții lichide (cm/s), iar *a* este aria interfacială, sau aria suprafeței bulelor (cm^2).

Măsurarea coeficientului volumetric de transfer al oxigenului (K_La) reprezintă o combinație dintre coeficientul de transfer al masei și aria interfacială pentru oxigen, și este o metodă utilizată pentru caracterizarea capacității bioreactorului de a transfera oxigenul în cultura celulară. În acest sens, s-a constatat că valori scăzute ale K_La pot reduce creșterea unor culturi celulare vegetale, dar, în același timp, valorile mărite ale K_La pot să determine un efect inhibitor similar. Astfel, *Smart* și *Flower* (1981) au găsit că în cazul suspensiilor celulare de *Catharanthus roseus* cultivate într-un fermentator de capacitate mică (3 litri), creșterea celulară s-a redus atunci când valorile K_La au fost mai mici de 5/oră, și a fost lineară la valorile cuprinse între 5 și 10/oră. Dacă se trece peste pragul acestor valori, în final are loc declinul producției de biomasă celulară. Totuși, atunci când au fost utilizate bioreactoare de un tip mai nou (*Maxblend Fermentor*®), având un sistem de aerare-agitare mai special (*Yokoi* și colab., 1993), suspensiile celulare de *Catharanthus roseus* au crescut corespunzător chiar și la valori mai mari ale K_La. Astfel, la nivelul de 20/oră, biomasa celulară uscată a ajuns la 19 g/l, față 9,5 g/l, nivel care s-a înregistrat în cazul suspensiilor crescute într-un fermentator convențional, la aceleași valori ale K_La. După acești autori, diferențele semnalate se datorează caracteristicilor superioare ale noului tip de fermentator folosit de ei, în care se realizează o suplimentare superioară cu oxigen, un stres hidrodinamic scăzut, precum și o aerare și o mixare superioară, chiar și în cazul culturilor celulare foarte vâscoase.

5.6.2.3. Spumarea și adeziunea de suprafață a celulelor vegetale

Efectul de spumare constituie o trăsătură comună tuturor tipurilor de bioreactoare, iar în cazul culturilor de celule vegetale, spumarea este, adeseori, cauza adeziunii biomasei celulare la interfața lichid-gaz și de peretele intern al vasului bioreactorului. Această problemă a fost dezbătută în mai multe rânduri, dar există puține studii cu privire la factorii implicați în spumare.

O particularitate mai deosebită a culturilor celulare vegetale este aceea că în perioada în care suspensiile se apropie de sfârșitul fazei lor exponențiale de creștere, se mărește adezivitatea suprafeței celulelor. Celulele se unesc rapid și formează o masă spumoasă, care se ridică și, întărindu-se, poate forma adevărate cruste la suprafața mediului, sau dopuri care pot astupa orificiile tuburilor prin care este evacuat mediul (în special la vasele

în care celulele se cultivă în sistem continuu). În aceste cruste este reținut un procent ridicat de celule, din totalul celulelor aflate în suspensie, și ele pot opri fluxul de circulație al culturii în bioreactoarele cu liftare de aer. Adezivitatea mărită și spumarea se pare că sunt cauzate, așa cum am mai arătat, de producerea polizaharidelor extracelulare.

Mai mulți cercetători, utilizând anumiți antispumanți, au găsit că aceștia nu sunt toxici pentru o serie de culturi de suspensii celulare vegetale (*Wang* și *Staba*, 1963; *Wilson* și colab., 1970; *Kato* și colab., 1976 a). Totuși, *Martin* (1980) a observat că adăugarea de polipropilenglicol, ca antispumant, la culturile celulare de *Ipomoea*, a avut ca efect scăderea ratei de creștere a acestora. *Yasuda* și colaboratorii (1972) au arătat că micșorarea intensității spumării și a adeziunii, poate fi obținută prin reducerea mărimii bulelor și a ratei fluxului de gaz, iar *Kato* și colaboratorii (1977) au reușit să scadă spumarea, prin reducerea vitezei de rotație a agitatorului.

5.6.2.4. Alți parametri de cultură

În timp ce microorganismele preferă, în mod normal, un pH constant al mediului în care cresc, celulele plantelor nu au astfel de cerințe. În general, pH-ul optim pentru creșterea suspensiilor celulare vegetale, este cuprins între valorile 5 și 6. În momentul inoculării, pH-ul mediului este în jur de 5,7 - 5,8, după care acesta scade rapid până la valori de 4 – 5, pentru ca apoi el să crească încet, până la 6 și chiar mai mult. Modificările pH-ului se datorează, în primul rând, capacității celulelor vegetale cultivate *in vitro* de a absorbi selectiv, și în anumite etape ale ciclului lor de creștere, diferiți ioni din mediu și de a elimina protoni. Rezultatele obținute în urma experimentelor în care s-a testat efectul menținerii controlate a pH-ului, la anumite valori, asupra creșterii suspensiilor celulare, vegetale, sunt ambigue. Astfel, *Rose* și *Martin* (1975) crescând culturi de suspensii celulare de *Ipomoea batatas*, în condiții controlate de pH, au găsit că acest procedeu afectează mai degrabă utilizarea ionilor de azotat și de amoniu, decât fiziologia celulelor. Totuși, în alte suspensii celulare menținerea pH-ului la anumite valori, poate să influențeze negativ creșterea celulară.

Studiile privind influența temperaturii asupra culturilor celulare vegetale, au scos în evidență faptul că valoarea optimă pentru creșterea celulelor este cuprinsă între 25 și 30°C. Deși sunt puține cercetări cu privire la acest aspect, în unele cazuri s-au observat anumite modificări în metabolismul celulelor crescute la nivele diferite de temperatură. Astfel, *Kato* și colaboratorii (1976 b) au crescut suspensii celulare de tutun la temperaturi

cuprinse între 17,5 şi 37°C şi au găsit că optimum de temperatură, necesar pentru obținerea de biomasă celulară şi pentru menținerea unei rate adecvate pentru creşterea celulelor, a fost de 28°C, în timp ce temperatura de 34°C a avut ca efect deteriorarea celulelor. Se pare că, de asemenea, temperatura poate să afecteze şi producția de metaboliți secundari. În acest sens, experimentele efectuate cu culturi celulare de *Catharanthus roseus* au demonstrat că la temperatura de 30°C rata creşterii a fost maximă, pe când producția de serpentină a fost maximă la 25°C (*Scragg*, 1988). Este normal deci, ca bioreactoarele, având în vedere rata scăzută a creşterii celulelor vegetale, să fie înzestrate cu instalații pentru termostatarea mediilor de cultură.

5.7. IMOBILIZAREA CELULELOR VEGETALE CULTIVATE *IN VITRO* SUB FORMĂ DE SUSPENSII

Conceptul de *imobilizare* a celulelor este cunoscut de mai mult timp, sub un alt termen legat de cercetările de enzimologie microbiană, şi anume, acela de "enzime *ataşate* de o suprafață solidă".

O metodă asemănătoare cu imobilizarea enzimelor este aceea a imobilizării celulelor întregi, celule care prezintă activitățile enzimatice dorite, metodă care elimină timpul şi etapele costisitoare legate de extragerea şi purificarea enzimelor.

Termenul de celule imobilizate, utilizat în cazul celulelor de cormofite, este definit ca un sistem în care celulele, ataşate fiind de suprafețele unor suporturi, sunt obligate să rămână în cultură pe/sau într-o regiune restrânsă de spațiu.

În ceea ce priveşte sistemele de imobilizare, în care se utilizează celulele procariote, rețin – în prezent – mai mult atenția, deoarece astfel de celule se multiplică fără greutate, în condiții industriale. Totuşi, în ultimul timp, aria de aplicare a acestei tehnici s-a extins, fiind imobilizate şi celulele cormofitelor. De asemenea, s-au imobilizat protoplaşti, organite celulare (cloroplaste, mitocondrii), precum şi organe sau organisme întregi (de exemplu embrioni). Indiferent de tipul de celulele întrebuințate pentru imobilizare, procariote sau eucariote, se pune întrebarea: care agent biologic vom alege şi în ce scop? Pentru a se răspunde la această întrebare, în alegere va trebui să se țină seama de o serie de criterii, cum sunt: a) existența sistemului complex format din: enzime – mebrană celulară – perete celular – matricea folosită pentru imobilizare; b) schimbul dintre substrat şi celule (enzime); c) interacțiunea mediilor de cultură lichide cu suprafața celulară;

d) manifestarea reacțiilor biochimice care este de dorit să aibă loc, în celulele intacte (*Kennedy*, 1980).

Metodele utilizate pentru imobilizarea celulelor vegetale sunt subiective şi, de aceea, este imposibilă sugerarea alegerii unei metode universale eficiente. În prezent, cercetările se orientează spre găsirea unei matrice care poate permite o imobilizare facilă, sigură şi o interacțiune bună a celulelor cu substratul. După *Novais* (1988), metodele de imobilizare cunoscute, pot fi clasificate după mai multe criterii, dar, în general, ele se împart în trei categorii mari:

1. Imobilizarea prin legare de:
   a) un suport solid, prin adsorbție fizică, legături ionice sau covalente;
   b) un suport solid, prin legături intermoleculare sau intercelulare.
2. Imobilizarea prin includere:
   a) în geluri;
   b) în fibre;
   c) microîncapsulare;
   d) inserție între membrane sintetice.
3. Peletizare, floculare, agregare.

Dacă imobilizarea enzimelor şi a celulelor micorbiene are o vechime de peste 30 de ani, imobilizarea celulelor cormofitelor a fost efectuată pentru prima dată, în anul 1979, de către *Brodelius* şi colaboratorii (1979), prin includerea celulelor mai multor specii de plante, cum sunt *Morinda citrifolia, Catharanthus roseus* şi *Digitalis lanata*, în gel de alginat. De atunci, tehnicile de imobilizare s-au diversificat, realizările obținute fiind semnalate de mai mulți autori (*Brodelius* şi *Mosbach*, 1982; *Lindsey* şi *Yeoman*, 1986; *Novais*, 1988 etc.).

5.7.1. Scopul imobilizării celulelor cormofitelor şi aplicațiile practice ale acestei tehnici

Dezvoltarea proceselor biotehnologice, în scopul exploatării impresionantului potențial biosintetic al celulelor cormofitelor, s-a focalizat în direcția propagării *in vitro* a țesuturilor şi celulelor vegetale. Celulele vegetale cultivate sub formă de suspensii s-au bucurat de o atenție deosebită datorită creşterii lor rapide şi a posibilității acestora de a fi crescute în bioreactoare de tip industrial (*Flower*, 1983). Totuşi, cu anumite excepții, celulele vegetale – cultivate *in vitro* – sunt lipsite de capacitatea de a produce metaboliți secundari, la acelaşi nivel cu cel al plantelor intacte (*Brodelius*, 1985; *Ellis*, 1984). O explicație a acestui fenomen constă în aceea că sus-

pensiile celulare vegetale sunt heterogene şi nediferenţiate, particularităţi ce conduc la o limitare a capacităţii lor de a avea o comunicare intercelulară (*Yeoman*, 1978). În acest context, s-a observat – că la multe tipuri de culturi celulare – există o corelaţie inversă între intensitatea creşterii celulelor şi cea a acumulării metaboliţilor secundari, şi o corelaţie directă între diferenţierea celulară, declinul ratei de creştere şi acumularea compuşilor secundari (*Yeoman* şi colab., 1982). Astfel, s-a constatat că la suspensiile induse din unele specii de cormofite, cum ar fi cele care aparţin familiei *Solanaceae*, agregarea sau "diferenţierea parţială" a celulelor ar avea ca efect intensificarea sintezei metaboliţilor secundari (*Lindsey* şi *Yeoman*, 1983). În plus, există foarte multe dovezi care demonstrează că, la culturile celulare care prezintă un nivel mărit de agregare, rata creşterii este mică. În termeni simpli, fenomenul poate fi explicat prin faptul că, în condiţiile în care creşterea şi diviziunea celulară rapidă sunt simultane, precursorii (care, în general, sunt comuni ambelor tipuri de metabolism – primar şi secundar) vor fi utilizaţi cu precădere pentru sinteza metaboliţilor primari (de exemplu proteine).

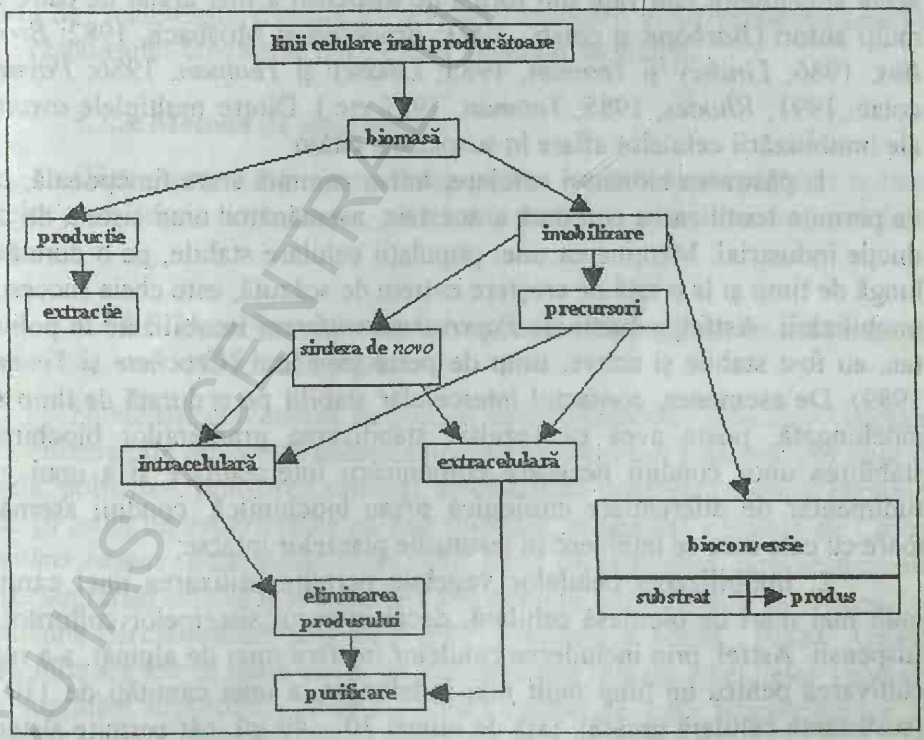


Fig. 68. Utilizări ale culturilor de celule vegetale imobilizate (după *Scragg*, 1991 a)

BCU IAŞI CENTRALĂ

Dacă creşterea celulelor este limitată, atunci aceiaşi precursori (de exemplu aminoacizii) vor fi disponibili şi pentru sinteza metaboliţilor secundari (aşa cum sunt fenolii şi alcaloizii) (*Lindsey* şi *Yeoman*, 1986). Astfel că, prin imobilizarea celulelor vegetale se va crea acel microclimat specific, care va deţine condiţile necesare pentru un contact inercelular mult mai îndelungat şi pentru iniţierea citodiferenţierii, procese care, aşa cum am mai arătat, pot să aibă ca efect inducerea sau sporirea sintezei metaboliţilor secundari. De asemenea, prin astfel de procedee se pot fabrica aşa numitele "seminţe artificiale", prin includerea embrionilor somatici în diferite matrici artificiale şi utilizarea acestora în micropropagarea cormofitelor.

Beneficiile imobilizării variază ca importanţă, dar, în general, ele pot fi reprezentate schematic pe baza câtorva criterii (fig. 68).

5.7.2. Avantajele imobilizării celulelor cormofitelor

Avantajul real şi potenţial al celulelor vegetale, imobilizate, faţă de acela al celulelor cultivate sub formă de suspensii a fost arătat de către mai mulţi autori (*Barbotin* şi colab., 1993; *Brodelius* şi Mosbach, 1982; *Brodelius*, 1986; *Lindsey* şi *Yeoman*, 1983; *Lindsey* şi *Yeoman*, 1986; *Payne* şi colab.,1991; *Rhodes*, 1985; *Yeoman*, 1987 etc.). Dintre multiplele *avantaje* ale imobilizării celulelor aflate în suspensie, citãm:

1. păstrarea biomasei celulare, într-o anumită stare funcţională, care va permite reutilizarea continuă a acesteia, asemănător unui sistem de producţie industrial. Menţinerea unei populaţii celulare stabile, pe o durată cât lungă de timp şi la o rată de creştere extrem de scăzută, este cheia succesului imobilizării. Astfel, celulele de *Papaver somniferum* imobilizate în poliuretan, au fost stabile şi active, timp de peste şase luni (*Crochete* şi *Yeoman*, 1989). De asemenea, contactul intercelular stabilit pe o durată de timp mai îndelungată, poate avea ca rezultat stabilizarea gradienţilor biochimici, stabilirea unor condiţii necesare comunicării intercelulare şi a unui grad rudimentar de diferenţiere citologică şi/sau biochimică, condiţii asemănătoare cu cele care se întâlnesc în ţesuturile plantelor intacte;

2. imobilizarea celulelor vegetale permite utilizarea unei cantităţi mult mai mari de biomasă celulară, decât în cazul sistemelor culturilor de suspensii. Astfel, prin includerea celulelor în sfere mici de alginat, s-a reuşit cultivarea pentru un timp mult mai îndelungat, a unei cantităţi de 110 g/l (susbstanţă celulară uscată), faţă de numai 30 – 40 g/l, cât permite sistemul culturilor de suspensii celulare. Această densitate celulară foarte ridicată

mare conduce la mărirea volumetrică a productivității și la crearea unui sistem de cultură mult mai compact;

3. separarea celulelor de mediul de cultură este benefică, în special în cazul în care celulele excretă (în mod natural sau artificial) în mediu, produșii pe care îi sintetizează. În acest mod, atât produsul dorit, cât și eventualii inhibitori metabolici pot fi scoși din mediu, iar celulele imobilizate pot fi reutilizate;

4. separarea fazei de creștere, de cea de producție, se face prin utilizarea alternativă de medii în care este favorizată creșterea celulară, cu medii care stimulează sinteza metaboliților secundari;

5. prin imobilizarea celuleor se realizează o protecție a acestora față de forțele de forfecare, prezente în mediul lichid de cultură, forțe care iau naștere în vasele bioreactoarelor, în care se folosesc – pentru agitarea suspensiei celulare – agitatoare cu palete;

6. alte avantaje: a) stocarea celulelor și a organitelor pentru perioade nelimitate de timp, prin crioconservarea lor *in vitro*; b) studierea fenomenului de "recunoaștere celulară", a rolului agregării în diferențierea celulară și a răspunsului biochimic al celulelor vegetale, la infecții.

5.7.3. Metode de imobilizare

Dintre toate tehnicile utilizate pentru imobilizarea celulelor cormofitelor vom descie doar câteva, care sunt, probabil, și cel mai frecvent folosite:

5.7.3.1. Imobilizarea celulelor vegetale prin legarea lor de un suport solid – adsorbția.

Numeroși cercetători au studiat comportamentul celulelor vegetale, imobilizate prin *adsorbția* acestora pe diferite suporturi realizate din fibre de sticlă, polistiren, polistiren sulfonat, tereftalat de polietenă, metale, ceramică etc. În astfel de experimente au fost utilizate, în special, celulele de *Catharanthus roseus*, determinându-se rolul jucat de tensiunea care se dezvoltă între suprafața celulelor și suprafața substratului imobilizator, în procesul de adeziune (*Archambault* și colab., 1989; *Facchini* și colab., 1988). Această adeziune are loc în două etape: a) interacțiunea inițială a celulelor vegetale, cu suprafața suportului, ce este mediată numai de forțe fizico-chimice; b) retenția intimă a celulelor pe substrat, ca urmare a secreției de polizaharide de către peretele celular (*Facchini* și colab., 1988). Cu toate că această thenică reduce mult din costul operațiilor, în cazul celulelor *de C. roseus* ea nu

a condus la formarea alcaloizilor bisindolici, idiferent de materialele folosite pentru imobilizare (*Facchini* şi *Cosmo*, 1991 b). Fibrele de sticlă au fost utilizate pentru imobilizarea celulelor de *Thalictrum rugosum*, dar berberina a fost produsă în cantităţi mai mici, în comparaţie cu nivelul sintezei de berberină înregistrat la suspensiile celulare (*Facchini* şi *Cosmo*, 1991 a).

5.7.3.2. Fixarea între membrane artificiale

Fixarea celulelor vegetale între *membrane semipermeabile*, formate dintr-o reţea de fibre goale în interior, este o altă metodă de imobilizare. Unităţile de fibre goale pot fi sterilizate iar celulele plantelor cultivate *in vitro* pot fi introduse între unităţile de fibre. Mediul şi aerul circulă prin interiorul acestor fibre, cu perete poros, trec prin el şi, astfel, ele ajung la celule, asigurând hrănirea şi aerarea acestora (*Scragg*, 1991 a). În figura 69 este redată schema unei astfel de instalaţii, în care celule stau fixate între reţelele de fibre goale.

5.7.3.3. Includerea celulelor vegetale în geluri

A. Includerea în gel, prin formarea unei reţele ionice

Metoda cea mai frecvent utilizată pentru imobilizarea celulelor vegetale cultivate *in vitro*, constă în *includerea* acestora într-un polimer. Pot fi întrebuinţaţi polimeri naturali, cum sunt alginatul, agarul sau caraagenanul, precum şi cei sintetici (poliacrilamide). Polimerul cel mai des folosit este

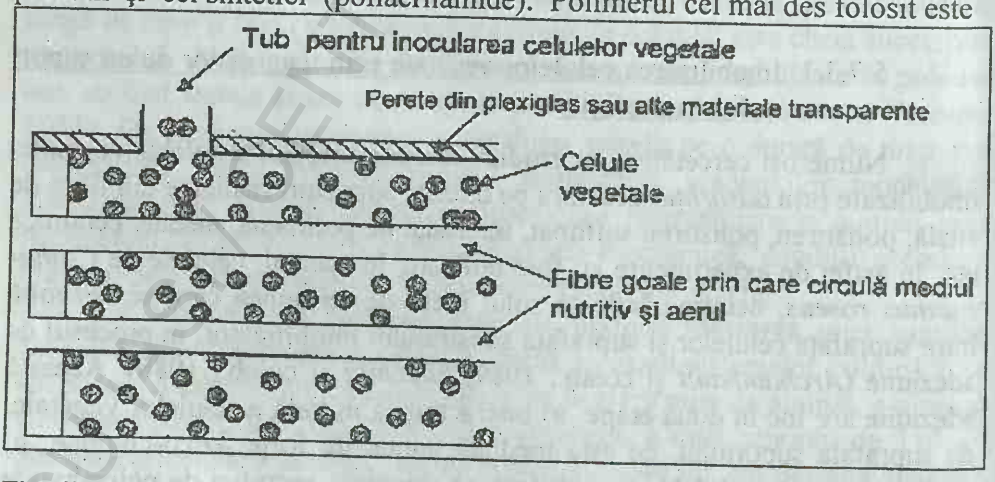


Fig. 69. Schema imobilizării celulelor vegetale între membrane formate din reţele de fibre goale (după *Scragg*, 1991 a)

alginatul de sodiu. Alginatul este un polizaharid alcătuit din molecule de acid gluronic şi manuronic. Polimerizarea se produce atunci când ionii de sodiu din alginat sunt substituiţi de ioni bivalenţi (Ca^{2+}, Ba^{2+}, etc.), care leagă între ele, într-o reţea, moleculele de acid glucuronic.

Procedeul este foarte simplu şi constă în picurarea unui amestec format din alginat lichefiat + celule vegetale, recoltate dintr-o suspensie, într-o soluţie de $CaCl_2$. În momentul contactului alginatului lichefiat cu soluţia de clorură de calciu, are loc gelifierea acestuia, respectiv formarea reţelei ionice în picăturile de alginat, picăturile transformându-se în mici sfere de alginat de calciu, în interiorul cărora sunt cuprinse celulele vegetale (fig. 70).

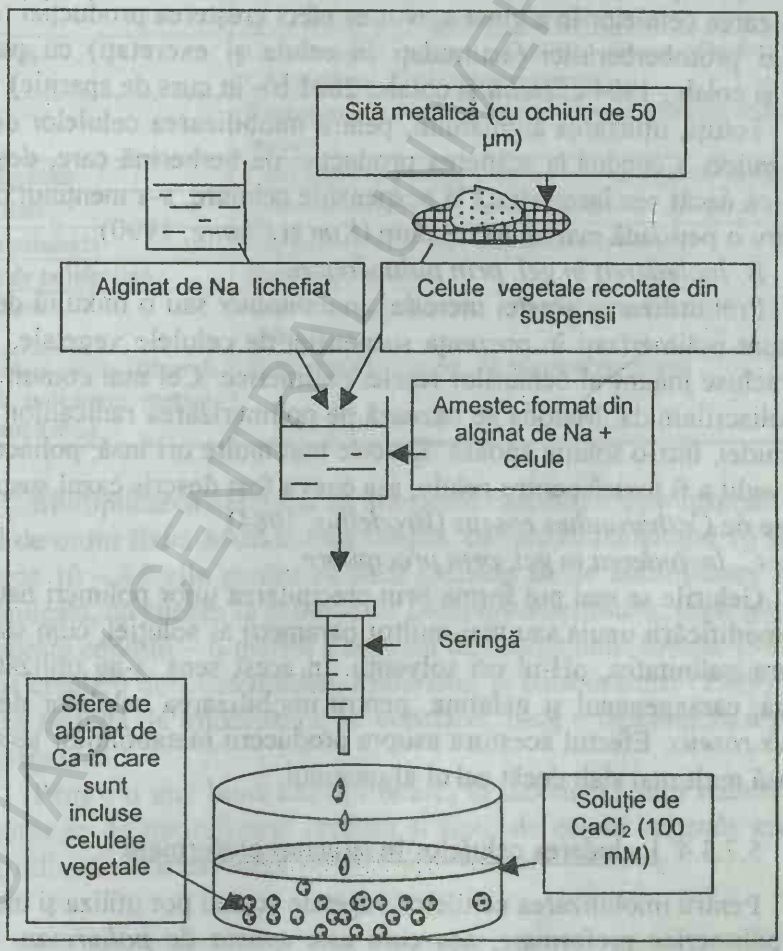


Fig. 70. Reprezentarea schematică a protocolului de imobilizare, sau încapsulare, a celulelor vegetale, în mici sfere de alginat de calciu (după *Deliu*, date nepublicate)

Utilizarea cu preponderență a alginatului se datorează faptului că acesta nu prezintă efecte toxice asupra celulelor vegetale şi, nu de puține ori, chiar stimulează producția de metaboliți secundari. De la prima imobilizare a celulelor vegetale în alginat de către *BroDelius* şi colaboratorii (1979), numărul cercetătorilor care au aplicat această metodă a crescut an de an. Astfel, *Asada* şi *Shuler* (1989), imobilizând celulele de *Catharanthus roseus*, au obținut de trei ori mai multă ajmalicină, decât în cazul culturii similare de suspensii celulare. De asemenea, *Kim* şi *Chang* (1990) au semnalat creşterea producției de şiconine de 2,5 ori, ca urmare a imobilizării celulelor de *Lithospermum erythrorhizon*, în alginat. În cazul unei linii celulare de *Berberis parvifolia*, care excreta – în mod spontan – alcaloizi în mediu, imobilizarea celulelor în alginat a avut ca efect creşterea producției totale de alcaloizi protoberberinici (acumulați în celule şi excretați) cu peste75% (*Deliu* şi colab., 1994 c; *Deliu* şi colab., 2001 b – în curs de apariție).

Totuşi, utilizarea alginatului, pentru imobilizarea celulelor de *Thalictrum minus* a condus la scăderea producției de berberină care, deşi a fost mai mică decât cea înregistrată la suspensiile celulare, s-a menținut constantă pentru o perioadă mai lungă de timp (*Kim* şi *Chang*, 1990)

B. Includerea în gel, prin polimerizare

Prin utilizarea acestei metode, un monomer sau o mixtură de monomeri sunt polimerizați în prezența suspensiei de celulele vegetale, celulele fiind incluse înăuntrul ochiurilor rețelei polimerice. Cel mai comun polimer este poliacrilamida. Metoda se bazează pe polimerizarea radicalilor liberi ai acrilamidei, într-o soluție apoasă. De cele mai multe ori însă, poliacrilamida s-a dovedit a fi toxică pentru celule, aşa cum a fost descris cazul suspensiilor celulare de *Catharanthus roseus* (*Brodelius*, 1984).

C. Includerea în gel, prin precipitare

Gelurile se mai pot forma prin precipitarea unor polimeri naturali, în urma modificării unuia sau mai multor parametri ai soluției, cum sunt: temperatura, salinitatea, pH-ul ori solvenții. În acest sens, s-au utilizat agarul, agaroza, caraagenanul şi gelatina, pentru imobilizarea celulelor de *Catharanthus roseus*. Efectul acestora asupra producerii metaboliților secundari a fost însă mult mai slab decât cel al alginatului.

5.7.3.4. Includerea celulelor în structuri preformate

Pentru imobilizarea celulelor vegetale se mai pot utiliza şi unele structuri polimerice preformate, aşa cum este *spuma* de *poliuretan*. Celulele sunt amestecate cu aceste materiale (tăiate sub forma de cuburi) şi ele mi-

grează în interiorul rețelei de poliuretan crescând, ulterior, în cavitățile acestuia.

Tabelul 17. Imobilizarea celulelor vegetale cultivate *in vitro* (după *Brodelius*, 1986; *Scragg*, 1991 a)

Sistemul de imobilizare	Speciile de plante cultivate *in vitro*
Alginat	*Cannabis sativa, Catharanthus roseus, Coffea arabica, Daucus carota, Digitalis lanata, Glycine max, Lavandula vera, Morinda citrifolia, Mucuna pruriens, Nicotiana tabacum, Papaver somniferum, Silybum marianum, Ipomoea* sp., *Thalictrum rugosum, Tagetes minuta*
Agaroză	*Catharanthus roseus, Daucus carota, Datura innoxia, Glycine max, Thalictrum rugosum*
Agar	*Catharanthus roseus, Daucus carota, Glycine max, Tagetes minuta*
Caraagenan	*Catharanthus roseus, Daucus carota, Tagetes minuta*
Chitosan	*Amaranthus tricolor, Asclepias syriaca, Apium graveolens*
Poliacrilamidă	*Capsicum frutescens, Catharanthus roseus*
Oxid de polifenilen	*Solanum aviculare*
Poliuretan	*Capsicum frutescens, Thalictrum rugosum, Dioscorea deltoidea*
Suporturi solide (fibre de sticlă, polistiren, metale, ceramică etc.)	*Catharanthus roseus, Thalictrum rugosum*

Multiplicarea celulelor în interiorul cavităților este limitată prin restricții de ordin fizic. Metoda este simplă, dar are dezavantajul că sunt necesare cca 10 – 15 zile pentru ca toate celulele să fie imobilizate. Tehnica a fost aplicată, cu succes la celulele de *Dioscorea deltoidea*, unde s-a observat – în aceste condiții – o mărire a sintezei de diosgenină (*Ishida*, 1988). Tot la culturi celulare de *D. deltoidea*, *Robertson* și colaboratorii (1989), aplicând aceeași metodă de imobilizare, au constatat, însă, o descreștere a producției de diosgenină.

Pentru o mai bună exemplificare, în tabelul 17 sunt redate principalele sisteme de imobilizare, precum și tipul de celule vegetale cultivate *in vitro*, utilizate în acest scop.

5.7.4. Efectele imobilizării asupra proprietăților celulelor vegetale.

5.7.4.1. Metabolismul primar.

Unii autori au arătat că, în cazul sistemelor celulelor imobilizate, există anumite limitări ale difuziei gazelor şi ale mediului nutritiv înspre interiorul sistemului, limitări care pot conduce la o scădere a eficienței acestora. Ca urmare a imobilizării, proprietățile celulelor se modifică prin crearea unui micromediu în matricea imobilizantă, micromediu care diferă – într-o oarecare măsură – de mediul înconjurător (*Novais*, 1988). Totuşi, alte studii au scos în evidență faptul că, mai ales în cazul imobilizării celulelor în geluri (alginat), atunci când se respectă nivelul concentrațiilor compuşilor utilizați pentru imobilizare, gelurile formate sunt perfect permeabile pentru nutrienți şi pentru aer (*Lindsey* şi *Yeoman*, 1984).

Desigur, proprietatea cea mai importantă a biogelurilor trebuie să fie aceea de a permite ca celulele imobilizate să-şi păstreze viabilitatea. În acest sens, s-a constatat că cele mai toxice matrice s-au dovedit a fi cele care necesită aplicarea de tratamente cu glutaraldehidă, aşa cum este gelatina şi poliacrilamida (*Brodelius* şi *Nilsson*, 1980).

Deşi stabilitatea funcțională a celulelor vegetale imobilizate se poate modifica, totuşi, ea este mult mai mare decât a celor aflate sub formă de suspensii. Un fenomen care se întâlneşte adeseori în sistemele imobilizate, este distrugerea matricelor (geluri de agar, agaroză, alginat), sau ieşirea celulelor din aceste matrice (de exemplu din poliuretan) datorită multiplicării şi creşterii acestora în volum. Acest fenomen poate fi controlat prin reglarea nivelului unor nutrienți limitatori ai creşterii celulare, aflați în mediul de cultură (de exemplu: scăderea concentrației de fosfați sau înlăturarea fitohormonilor).

5.7.4.2. Metabolismul secundar

Cu toate că în multe cazuri s-au remarcat creşteri marcante în acumularea metaboliților secundari în celulele vegetale imobilizate, totuşi, există şi exemple în care imobilizarea are ca efect scăderea sintezei acestor compuşi (tabelul 18).

Tabelul 18. Efectul imobilizării culturilor de celule vegetale asupra sintezei metaboliților secundar (după *Brodelius*, 1986; *Yeoman*, 1987)

Substratul imobilizant	Cultura celulară	Metabolitul principal	Productivitatea
Alginat	*Morinda citrifolia*	antrachinone	crește
	Catharanthus roseus	ajmalicină	crește
	Nicotiana tabacum	fenoli	crește
Alginat sau poliuretan	*Capsicum frutescens*	capsaicină	crește
Alginat sau caraagenan	*Catharanthus roseus*	ajmalicină	crește
Poliuretan	*Dioscorea deltoidea*	diosgenină	crește
Fibre de sticlă	*Catharanthus roseus* *Thalictrum rugosum*	Ajmalicină berberină	Scade scade
Poliacrilamidă	*Catharanthus roseus*	ajmalicină	scade

Studii importante au fost realizate de asemenea și în direcția selecției de linii celulare capabile să elimine compușii secundari în mediu, sau în permeabilizarea membranelor celulare. În acest context, *Nakagawa* și colaboratorii (1984) au reușit să izoleze o linie celulară de *Thalictrum minus* care excretă o mare parte de berberină în mediul de cultură. De asemenea, *Koge* și colaboratorii (1992) au selectat linii celulare de *Coffea arabica* care sunt capabile să producă cofeină și teobromină, alcaloizi pe care îi elimină, în mare parte, în mediul de cultură. O altă direcție de cercetare a fost și aceea a utilizării celulelor imobilizate, în scopul *biotransformării* unor compuși. Astfel, prin imobilizarea celulelor vegetale în gel de alginat, s-a reușit biotransformarea metildigitoxinei în metildigoxină, de către culturile celulare de *Digitalis lanata* (*Alfermann* și colab. 1983), iar cele de *Papaver somniferum* au transformat codeinona în codeină (*Furuya* și colab., 1984).

Multe cercetări, privind posibilitatea aplicării sistemelor celulare imobilizate, s-au orientat și spre introducerea acestor tipuri de cultură, în bioreactoare. În acest sens, au fost utilizate cu succes fermentatoare cu liftare de aer, asemănătoare cu cele folosite pentru suspensiile celulare, prevăzute cu anumite adaptări speciale. Astfel, recent, *Tyler* și colaboratorii (1995) au arătat posibilitatea cultivării cu succes a celulelor câtorva specii de plante (*Catharanthus roseus*, *Thalictrum rugosum*), imobilizate în sistemul adeziunii de suprafață, prin utilizarea unor bioreactoare de o construcție mai deosebită. De asemenea, autorii au arătat că pentru imobilizarea culturilor celulare, la anumite suprafețe, s-au folosit două tehnologii, și anume: a) aceea a lui *Fachini-DiCosmo*, în care suportul pentru imobilizare era alcătuit

din mai multe variante de materiale (polistiren, polistiren sulfonat şi fibre de sticlă) şi b) tehnologia lui *Archambault-Volesky-Kurz*, în care suportul era format din fibre scurte de poliester. Bioreactoarele utilizate erau dotate cu mixare prin agitare mecanică şi aerare (bioreactoare de 2 litri), sau numai cu liftare de aer (bioreactoare de 6 litri).

5.8. PERSPECTIVELE CULTURILOR DE CELULE VEGETALE INDUSE DIN CORMOFITE

Culturile de suspensii celulare, vegetale, sunt alcătuite din celule autonome şi din agregate celulare, care sunt dispersate în mediu. Prin urmare, ele sunt – din punct de vedere fiziologic – mai omogene (şi potenţial mai controlabile), decât plantele intacte (normale) şi, de aceea, ele oferă mai multe avantaje în producerea de compuşi naturali vegetali. Unul dintre beneficiile totipotenţei şi a omogenităţii culturilor celulare constă în posibilitatea creşterii lor în vase cu volume foarte mari, de peste 10.000 de litri. Într-adevăr, utilizarea culturilor de ţesuturi şi celule vegetale în scopul obţineii de compuşi chimici, în condiţii controlate, ferite de influenţa factorilor de mediu la care sunt spuse plantele în habitatul lor natural, prezintă numeroase *avantaje*. Astfel, capacitatea de a produce compuşi chimici de calitate şi în cantităţi previzibile, precum şi posibilitatea sporirii producţiei faţă de cea realizată de către plantele intacte, sunt câteva dintre beneficiile majore pe care le aduc suspensiile celulare vegetale. Un alt avantaj al sistemului culturilor celulare constă şi în capacitatea lor de a produce substanţe biochimice noi, care nu sunt sintetizate în mod normal de către plantele intacte.

Din punct de vedere comercial, mai importante sunt două dintre ariile biotehnologiei culturilor de ţesuturi şi celule vegetale, şi anume: micropropagarea şi producerea de compuşi biochimici (enzime şi metaboliţi secundari). Uniformitatea populaţiilor care rezultă în urma micropropagării poate fi avantajoasă nu numai pentru înmulţirea plantelor, atunci când se iau în considerare anumite caracteristici, cum sunt productivitatea şi morfologia lor, ci şi pentru sintetizarea de substanţe chimice, de origine vegetală. Pe de altă parte, micropropagarea, *via* calus, poate crea diversitate în cadrul populaţiilor (variaţia somaclonală), diversitate ce poate fi privită ca un avantaj, dar şi ca un dezavantaj, în funcţie de aplicarea ei biotehnologică. De asemenea, variabilitatea genetică – care se produce în cadrul sistemului culturilor de celule vegetale – poate fi utilizată în ameliorarea plantelor, prin selectarea de linii celulare. Micropropagarea, împreună cu selecţia celulară şi cu transformarea genetică, prezintă o mare importanţă practică, pentru o serie

de domenii, cum sunt horticultura, agricultura, industria farmaceutică ş.a.m.d. Într-adevăr, micropropagarea este utilizată de mai mult timp, în producţia plantelor ornamentale şi a celor de cultură. De exemplu, de mai mulţi ani, compania multinaţională Unilever utilizează micropropagarea, prin embriogeneză somatică, a palmierului de ulei (*Elaies* sp.) (*Allan*, 1991). Micropropagarea prin embrioni somatici, încapsulaţi sau nu în geluri, cu producere de seminţe artificiale, din culturi de suspensii celulare, face obiectul unui capitol cuprins într-un viitor volum.

Compuşii biochimici vegetali sunt utilizaţi ca medicamente, insecticide, fungicide, uleiuri volatile, aromatizanţi, coloranţi etc. Majoritatea acestor compuşi sunt izolaţi din plante a căror habitat este de multe ori destul de restrâns. Pe de altă parte, ei se pot forma doar într-un anumit stadiu de dezvoltare al plantelor, sau pot fi doar intermediari tranzitorii în metabolismul acestora. Aceşti factori, combinaţi cu dificultăţile de obţinere, respectiv cu costurile mari de extragere şi de izolare, fac ca multe substanţe de natură vegetală să fie prea scumpe. Avantajul culturilor de ţesuturi şi celule vegetale, faţă de metodele tradiţionale, sugerează faptul că ele pot fi utilizate, cel puţin în mod teoretic, pentru producerea oricărui compus biochimic, vegetal.

BIBLIOGRAFIE

Alfermann, A.W., Bergmann, W., Figur, C., Helmhold, U., Schwantag, D., Schuller, I., Reinhard, E., 1983, Biotransformation of β-methyldigitoxin to β-methyldigoxin by cell cultures of *Digitalis lanata*. In: *Plant Biotechnology*, (ed. Mantell, S.H., Smith, H.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 67-74.

Allan, E. ,1991, Plant cell culture. In: *Plant Cell and Tissue Culture* (ed. Stafford, A., Warren, G.), Open University Press, Milton Keyness, p.1 –24.

Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V., Lucas, W.J., Gaber, R.F., 1992, Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, p. 3736-3740.

Archambault, J., Volesky, B., Kurz, W.G.W., 1989, Surface immobilization of plant cells. Biotechnol. Bioeng., **33**, p. 293-299.

Asada, M., Shuler, M.L., 1989, Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: effects of adsorption *in situ*, elicitors and alginate immobilization Appl., Microbiol. Biotechnol., **30**, p. 475-481.

Barbotin, J.N., Saucedo, J.E.N., Bazinet, C., Kersulec, A., Thomasset, B., Thomas, D., *1993*, Immobilization of whole cells and somatic embryos: Coating process and cell-matrix interactions. In: *Synseeds. Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement* (ed. Redenbaugh, K.), CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, p. 66-101.

Bayley, J.M., King, J., Gamborg, O.L., 1972, The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. Planta, **105**, p.15-24

Bayliss, M.W., 1977, Factors affecting the frequence tetraploid cells in a predominantly diploid suspension culture of *Daucus carota*. Protoplasma, **92**, p.109-121.

Bayliss, M.W., 1980, Chromosomal variation in plant tissues culture. Int. Rev. Cytol. Suppl., **11A**, p.113-144

Bayliss, M.W., 1985, Regulation of the cell division cycle in cultured plant cells. In: *The Cell Division Cycle in Plants* (ed. Bryant, J.A., Francis, D.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, p.157-177.

Beherend, J., Mateles, R.I., 1975, Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. I. Effect of amino acids on growth. Plant Physiol., **56**, p.584-597.

Ben-Hayyim, G., Neumann, H., 1983, Stimulatory effect of the glycerol on growth and somatic embryogenesis in *Citrus* callus cultures. Z.Pflanzenphysiol., **99**, p.471-474.

Bligny, R., Douce, R., 1977, Mithocondria of isolated plant cells (*Acer pseudo-platanus* L.). II. Copper deficiency effects on cytochrome *C* oxidase and oxygen uptake. Plant Physiol., **60**, p.675-688.

Brodelius, P., 1984, Immobilized viable plant cells, Ann. N.Y. Acad. Sci., **434**, p.382-393.

Brodelius, P., 1985, The potential role of immobilization in plant cell biotechnology, Trends Biotechnol., **3**, p.280-285.

Brodelius, P., 1986, Immobilized plant cells and protoplasts. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 4, *Tehniques and Applications* (ed Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., Yamada, Y.), Macmillan, New-York, p.287-315.

Brodelius, P., Deus, B., Mosbach, K., Zenk, M.H., 1979, Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. FEBS Lett., **103**, p.93-97.

Brodelius, P., Mosbach, K., 1982, Immobilized plant cells. Adv. Appl. Microbiol., **28**, p.1-26.

Brodelius, P., Nilsson, K., 1980, Entrapment of plant cells in different matrices: a comparative study, FEBS Lett., **122**, p.312-316.

Brown, S., Wetherell, D.F., Dougall, D.K., 1976, The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. Physiol. Plant., **37**, p.73-79

Burgess, J., 1985, *An Introduction to Plant Cell Development*. Cambridge University Press, Cambridge.

Cachiță, C.D., 1984, *Culturi de celule și țesuturi vegetale*, Ed. Ceres, București.

Cachiță, C.D., 1987, *Metode in vitro la plantele de cultură – baze teoretice și practice*, Ed. Ceres, București.

Cachiță, C.D., Sand, C., 2000, *Biotehnologie Vegetală*, Vol. 1, *Baze Teoretice și Practice*, Ed. "Mira Design", Sibiu.

Carceller, M., Davey, M.R., Flower, M.W., Street, H.E., 1971, The influence of sucrose, 2,4-D, and kinetin on the growth, fine structure, and lignin content of cultured sycamore cells. Protoplasma, **73**, p.24-36.

Carew, D.P., Krueger, R.J., 1977, *Catharanthus roseus* tissue culture: the effects of medium modification on growth and alkaloid production. Lloydia, **40**, p.326-331

Chong, C., Taper, C.D., 1974, *Malus* tissue cultures. II. Sorbitol metabolism and carbon nutrition. Can. J. Bot., **52**, p.2361-2364.

Chung, L.S., Kang, Y.M., Oh, J.H., Kim, T., Lee, H.J., Chae, Y.A., 1994, Continuous suspended cell culture of *Mentha piperita* in cell-recycled air-lift bioreactor. Bitechnol. Techniques, **8**, p.789-792.

Constabel, F., Kurz, W.G.W., Chatson, B., Gamborg, O.L., 1974, Induction of partial synchrony in soybean cell cultures. Exp. Cell Res., **85**, p.105-110.

Constabel, F., Kurz, W.G.W., Chatson, B., Kirkpatrick, J.W., 1977, Partial synchrony in soybean cell suspension cultures induced by ethylene. Exp. Cell Res., **105**, p. 263-268.

Constabel, F., Shyluk, J.P., Gamborg, O.L., 1971, The effect of hormones on anthocyanin accumulation in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. Planta, **96**, p. 306-316.

Corchete, P., Yeoman, M.M., 1989, Biotransformation of (-)-codeionine to (-)-codeine by *Papaver somniferum* cells immobilized in reticulate polyurethane foam. Plant Cell Rep., **8**, p.128-135.

Cousson, A., Tran Thanh Van, K., 1981, *In vitro* control of *de novo* Flower differentiation from tobacco thin cell layers cultured on a liquid medium. Physiol. Plant., **51**, p. 77-84.

Curtis, W.R., Emery, A.H., 1993, Plant cell suspension culture rheology. Biotechnol. Bioeng., **42**, p.520-526.

Deliu, C., 1985, Inducerea şi dezvoltarea calusului de *Phellodendron amurense*, In: *Lucrările celui de al III-lea Simpoyion Național de Culturi de Celule și Țesuturi Vegetale*, București, p. 445-447.

Deliu, C., 1991, Culturi de țesuturi şi celule la plante medicinale din familiile *Berberidaceae*, *Rutaceae* şi *Dioscoreaceae* în scopul obținerii de principii active din punct de vedere farmacologic. Teză de doctorat, Cluj-Napoca.

Deliu, C., Bota, C., Munteanu-Deliu, C., Cristea, V., Mocanu, S., 1998, Sinteza de cardenolide în culturi celulare de *Digitalis lanata*. Studia Univ."Babeş-Bolyai", Biol., **43**, p.77-85.

Deliu, C., Crăciun, C., Crăciun, V., Tămaş, T., 1994 a, Ultrustructural study of *Berberis parvifolia* root meristem and cell cultures. Plant Sci., **96**, p.143-150

Deliu, C., Fărcaş, A., Tămaş, M., 1991 a, *Dioscorea caucasica* Lipsky Tissue Culture. I. The action of some factors over callus development and diosgenin bisynthesis. In: *In vitro Explant Cultures, Present and Perspective. The IVth National Symposium on Plant Cell and Tissue Cultures* (ed. Cachiță C.D.), 1989, Cluj-Napoca, p.110-111.

Deliu, C., Fărcaş, A., Tămaş, M., 1991 b, *Dioscorea caucasica* Lipsky tissue culture. II. Effect of hormonal balance over sapogenin and phytosterol biosynthesis. In: *In vitro Explant Cultures, Present and Perspective. The IVth National .Symposium on Plant Cell and Tissue Cultures* (ed. Cachiță C.D.), 1989, Cluj-Napoca, p.111-113.

Deliu, C., Munteanu-Deliu, C., Cristina Bota, C., Halmagyi, A., Keul-Butiuc, A., 2001 a, Biotransformarea digitoxinei de către culturile de suspensii celulare de *Digitalis lanata*. Studia Univ. Babeş-Bolyai, Ser. Biol. (în curs de apariție).

Deliu, C., Munteanu-Deliu, C., Fodorpataki, L., Tămaş, M., 2001 b, Excretion of protoberberine alkaloids by immobilized cells of *Berberis parvifolia* in alginate beads. Contrib. Bot., Cluj-Napoca (în curs de apariție).

Deliu, C., Nicoară, A., Munteanu-Deliu, C., Bercea, V., Târnoveanu, D., Keul, M., 1992, Some aspects of the metabolism of *Berberis parvifolia* cell suspensions. Studia Univ. Babeş-Bolyai, **37**, p. 29-36.

Deliu, C., Tamaş, M., Ghiran, D., 1994 b, *Berberis* species: *In vitro* culture and the production of protoberberine and other alkaloids. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol.28, *Medicinal and Aromatic Plants VII*, (ed. Bajaj,Y.P.S.), Springer, Berlin, p. 56-71.

Deliu, C., Tămaş., M., Pitca, M., Nichiforescu, E., Tesio, B., 1985, Conţinutul în alcaloizi la *Berberis parvifolia* cultivată *in vitro*. În: Lucrările celui de *al III-lea Simpozion Naţional de Culturi de Celule şi Ţesuturi Vegetale*, Bucureşti, p. 249-253.

Deliu, C., Zăpârţan, M., Ispas, M., 1994 c, Immobilisation of higher plant cell culture. In: *Proceeding 8th Nat. Symp. Ind. Microbiol. Biotechnol* (ed. Anghel, I.), Univ. Bucharest, Bucharest, p. 388-396.

De Ruijter, N., Emons, A.M.C., *1993*, Immunodetection of spectrin antigens in plant cells. Cell Biol. Int., 17, p.-169-182.

Dixon, R.A., 1985, Isolation and maitenance of callus and cell suspension cultures. In: *Plant Cell Culture. A Practical Approach* (ed. Dixon, R.A.), IRL Press, Oxford, p.1-20.

Dougall, D.K., *1980*, Nutrition and metabolism. In: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemical* (ed. Staba, E.J.), CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p.21-58.

Earle, E.D., Torrey, J.G., 1965, Colony formation by isolated *Convulvulus* cells plated on defined media. Plant Physiol., 40, p.520-528.

Ellis, B.E., 1984, Probing secondary metabolism in plant cell cultures. Can. J. Bot., 62, p.2812-2819.

Eriksson, T., 1965, Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. Physiol. Plant., 18, p. 976-993

Eriksson, T., 1967, Duration of the mitotic cycle in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. Physiol. Plant., 20, p. 348-359.

Eskew, D.L., Welch, R.M., Cary, E.E., 1983, Nickel: An essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. Science, 222, p. 621-623.

Facchini, P.J., DiCosmo, F., 1991 a, Plant cell bioreactor for the production of protoberberine alkaloids from immobilized *Thalictrum rugosum* culture. Biotechnol. Bioeng., 37, p. 397-403.

Facchini, P.J., DiCosmo, F., 1991 b, Secondary metabolite biosynthesis in cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. immobilized by adhesion of to glass fibres. Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, p. 382-392.

Facchini, P.J., DiCosmo, F., Radvanyi, L.G., Gignere, Y., 1988, Adhesion of *Catharanthus roseus* cells to surfaces: effects of substrate hydrophobicity. Biotechnol. Bioeng., 32, p. 935-938.

Filner, P., *1966*, Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. Biochim. Biophys., 118, p. 299-305

Flügge, U.I., Fisher, K., Groß, A., Lottspeich, F., Eckerskorn, C., Sebald, W., 1989, The triose phosphatate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts nucleic acid sequence of a full length cDNA clone. EMBO J., 8, p. 39-46.

Flower, M.W., 1981, Plant cell bitechnology to produce desirable substance, Chem. Ind. (London), 7, p. 229-233.

Flower, M.W., 1982, The large-scale cultivation of plant cells. Prog. Ind. Microbiol., 17, p. 209-229.

Flower, M.W., 1983, Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. In: *Plant Biotechnology* (ed. Mantell, S.H., Smith, H,), Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 3-37.

Flower, M.W., Clifton, A., 1974, Activities of enzymes of carbohydrate metabolism in cells of *Acer pseudoplatanus* L. maintained in continuous (chemostat) culture, Eur. J. Biochem., 45, p. 445-450.

Furuya, T., Yoshikawa, T., Taira, M., 1984, Biotransformation of codeionine in codeine by immobilized cells of *Papaver somniferum*, Phytochemistry, **23**, p. 999-1002.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., **50**, p. 151-158.

Gamborg, O.L., Shyluk, J.P., 1970, The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source, Plant Physiol., **45**, p. 598-600.

Gamborg, O.L., Shyluk, J.P., 1981, Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue culture. In: *Plant Tissue Culture - Methods and Application in Agriculture* (ed. Thorpe, T.A.), Academic Press, New-York, p. 21-44.

Gautheret, R.J., 1959, *La culture de tissus vegetaux*, Masson et C^{cie}, Paris.

Gautheret, R.J., 1977, *La culture de tissus et des cellules des vegetaux*. Rezultats Generaux et Realisations Practique. Travaux dedies a la memoire de Georges Morel. Masson et C^{cie} Paris.

Gautheret, R.J., 1985, History of plant tissue and cell culture: a personal account. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (ed. Vasil, I.K.), Vol. 2, Academic Press, London, p. 1-59.

Gogarten, J.P., Bentrup, F.-W., 1989, Substrate specificity of the hexose carrier in the plasmalemma of *Chenopodium rubrum* suspension cells probed by transmembrane exchange diffusion. Planta, **178**, p. 52-60.

Grout, B.W.W., Chan, K.W., Simpkins, I., 1976, Aspects of growth and metabolism in a suspension culture of *Acer pseudoplatanus* (L.) grown on glycerol carbon source. J. Exp. Bot., 27, p.77-86.

Hahlbrock, K., Ebel, J., Oaks, A., 1974, Determination of specific growth stages of plant cell suspension cultures by monitoring conductivity changes in the medium. Planta, **118**, p. 75-83.

Harper, J.F., Surowy, T.K., Sussman, M.R., 1989, Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton-pump (H^+-ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, p. 1234-1238.

Hart, J.W., Filner, 1969 – Regulation of sulfate uptake by amino acids in cultured tobacco cells. Plant Physiol., **44**, p. 1253-1259.

Heller, R., 1953, Reserches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég.*, **14**, p. 1-223.

Heller, R., 1965, Some aspects of the inorganic nutrition of plant tissue cultures. In: *Plant Tissue Culture* (ed. White, P.R., Grove, A.R.), McCutchan Publ., Berkeley, California, p. 1-17.

Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., Duggar, B.M., 1946, The influence of the compo-sition of the medium on the growth *in vitro* excized tobacco and sunflower tissue culture. Am. J. Bot., **33**, p. 591-597.

Hoagland, D.R., Arnon, D.J., 1938, The water culture method for growing plants without soil, Univ. Calif. Agr. Exp. Stn. Circ., p. 347.

Ishida, B.K., 1988, Improved diosgenin production in *Dioscorea deltoidea* cell cultures by immobilization in polyurethane foam. Plant Cell Rep., 7, p. 270-273.

Kato, A., Fukasawa, A., Shimizu, Y., Soh, Y., Nagai, S., 1977, Requirements of PO_4^{3-}, NO_3^-, SO_4^{2-}, K^+, and Ca^{2+} for the growth of tobacco cells in suspension culture. J. Ferment. Technol., **55**, p. 207-212.

Kato, A., Kawazoe, S., Iizima, M., Shimizu, Y., 1976 a, Continuous culture of tobacco cells. J. Ferment. Technol., **54**, p. 82-87.

Kato, A., Hashimoto, Y., Soh, Y., 1976 b, Effect of temperature on the growth of tobacco cells. J. Ferment. Technol., **54**, p.754-757.

Kato, A., Kawazoe, S., Soh, Y., 1978, Viscosity of the broth of tobacco cells in suspension culture. J. Ferment. Technol., **56**, p.224-228.

Kato, A., Shiozawa, Y., Yamada, A., Nishida, K., Noguchi, M., 1972, A jar fermenter culture of *Nicotiana tabacum* L. cell susepensions. Agric. Biol. Chem., **36**, p.899-902.

Kennedy, J.F., *1980*, Current frontiers and quests in immobilized cell technology. Enzyme Microb. Technol., **2**, p. 164-165.

Kim, D.J., Chang, H.N., 1990, Enhanced shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* by *in situ* extraction and calcium alginate immobilization. Biotechnol. Bioeng., **36**, p. 460-466.

Kimball, S.L., Beversdorf, D., Bingham, E.T., 1975, Influence of osmotic potential on the growth and development of soybean tissue cultures. Crop Sci., **15**, p. 750-756.

King, P.J., Mansfield, K.J., Street, H.E., 1973, Control of growth and metabolism of cultured plant cells. Can. J. Bot., **51**, p. 1807-1823.

King, P.J., Street, H.E., 1973, Growth patterns in cell cultures. In: *Plant Tissue and Cell Culture* (ed. Street,H.E.), University of California Press, Berkeley, p. 269-337.

King, P.J., 1977, Studies on the growth in culture of plant cells. XXII. Growth limitation by nitrat and glucose in chemostat culture of *Acer pseudoplatanus* L. J. Exp. Bot., **28**, p.142-155.

Knop, W., 1865, Quantitative Untersu*Chung*en über den Ernährungsprozess der Pflanzen, Landw. Versuchs-Stat., 7, p. 93-107.

Koge, K., Orihara, Y., Furuya, I., 1992, Immobilization and culture of coffee (*Coffea arabica*) cells on novell culture systems using basket-shaped unit, "egstar". Biotechnol. Tech., **6**, p. 313-318.

Kreis, W., Reinhard, E., 1989, The production of secondary metabolites by plant cells cultivated in bioreactors. Planta Med., **55**, p. 409-416

Kurz, W.G.W., *1971*, A chemostat for growing higher plant cells in single cell suspension cultures. Exp. Cell Res., **64**, p. 476-479.

Kurz, W.G.W., Constabel, F., 1981, Continuous culture of plant cells. In: *Continuous Cultures of Cells* (ed. Calcott, P.H.), Vol.2, CRC Press, Boca Raton, Florida, p.141-157.

Lindsey, K., Yeoman, M.M., *1983*, *The relationship between growth rate and, differen*-tiation, and alkaloid accumulation in cell cultures. J. Exp. Bot., **34**, p. 1055-1065.

Lindsey, K., Yeoman, M.M., 1984, The viability and byosinthetic activity of cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv *Annuum*, immobilizated in reticulite polyurethane. J. Exp. Bot., **35**, p. 1684-1696.

Lindsey, K., Yeoman, M.M., 1985, Dynamics of plant cell cultures. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (ed.Vasil, K.I.), Academic Press, Inc., Orlando, p. 61-102.

Lindsey, K., Yeoman, M.M., 1986, Immobilized plant cells. In: *Plant Cell Culture Technology*. (Ed. Yeoman, M.M.), Blackwell, Oxford, p. 228-267.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.,**193**, p. 265-275.

Maretzki, A., Thom, M., Nickell, L.G., 1972, Influence of osmotic potentials on the growth and chemical composition of sugar cane cell cultures. Hawaii Plant. Rec., **58**, p.183-189.

Maretzki, A., Thom, M., Nickell, L.G., 1974, Utilization and metabolism of carbohydrates in cell and callus cultures. In: *Tissue Culture and Plant Science* (ed. Street, H.E.), Academic Press, London, p.14-31.

Martin, S.M., 1980, Environmental factors: B. Temperature, aeration and pH. In: *Plant Tissue Culture as a Source of Phytochemicals* (ed. Staba, E.J.), C.R.C. Press, Boca Raton, p. 143-148.

Martin, S.M., 1980a, Mass culture systems for plant cell suspensions. In: *Plant Tissue Culture as a Source of Phytochemicals* (ed. Staba, E.J.), C.R.C. Press, Boca Raton, p. 149-166.

Martinoia, E., 1992, Transport processes in vacuoles of higher plants. Bot. Acta, **105**, p. 232-245.

Matsumoto, T., Okunishi, K., Nishida, K., Noguchi, M., Tamaki, E., 1971, Studies on the culture conditions of higher plant cells in suspension culture. II. Effect of nutritional factors on the growth. Agric. Biol. Chem., **35**, p. 543-549.

Meijer, J.J., ten **Hoopen, H.J.G.**, van **Gameren, Y.M., Luyben, K.Ch.A.M., Libbenga, K.R.**, 1994, Effects of hydrodinamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. Enzyme Microb. Technol., **16**, p. 467-477.

Miller, R.A., Shyluk, J.P., Gamborg, O.L., Kirkpatrick, J.W., 1968, Phytostat for continuous culture and automatic sampling of plant cell suspensions. Science (N.Y.), **159**, p. 540-542

Misawa, M., Hayashi, M., Tabata, H., Ko, K., Misato, T., 1975, Production of plant virus inhibitor by *Phytolacca americana* suspension culture. Bitechnol. Bioeng., **17**, p. 1335-1347.

Monod, J., 1950, La technique de culture continuee. Théorie et application, Paris. Ann. Inst. Pasteur, **79**, p. 390-410.

Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., **15**, p. 473-497.

Murata, Y., Obi, I., Yoshihashi, M., Noguchi, M., Kakutani, T., 1994, Reduced permeability to K^+ and Na^+ ions of K^+ channels in the plasma membrane of tobacco cells in suspension after adaptation to 50 mM NaCl. Plant Cell Physiol., **35**, p. 87-92.

Nakagawa, K., Kongai, A., Fukui, H., Tabata, M., 1984, Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures. Plant Cell Rep., **3**, p. 254-257.

Nickell, L.G., Burkholder, P.R., 1950, Atypical growth of plants. 2. Growth *in vitro* of virus tumors of *Rumex* in relation to temperature, pH and various sources of nitrogen, carbon and sulphur. Amer. J. Bot., **37**, p. 538-547.

Nickell, L.G., Maretzki, A., 1970, The utilization of sugar and starch as carbon sources by sugarcane cell suspension cultures. Plant Cell Physiol., **11**, p. 183-185.

Nitsch, J.P., 1951, Growth and development *in vitro* of excised ovaries. Amer. J. Bot., **38**, p. 566-577.

Nitsch, J.P., Nitsch, C., 1969, Haploid plants from pollen grains, Science, **163**, p. 85-87.

Niu, X., Narasimhan, M.L., Salzman, R.A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 1993, NaCl regulation of plasma membrane H^+-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. Plant Physiol., **103**, p. 713-718.

Noguchi, M., Matsumoto, T., Hirata, Y., Yamamoto, K., Katsuyama, A., Kato, A., Azechi, S., Kato, K., 1977, Improvement of growth rates of plant cell cultures. In:

Plant Tissue Culture and its Bio-Technological Application (ed. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H.), Springer-Verlag, Berlin, p. 85-98.

Novais, J.M., 1988, Methods of immobilization of plant cells. In: *Plant Cell Biotechnology* (ed. Pais, M.S.S., Mavituna, F., Novais, J.M.), Springer, Berlin, p. 353-363.

Ohira, K., Ojima, K., Fujiwara, A., 1973, Studies on the nutrition of rice cell culture. I. A simple defined medium for rapid growth in suspension culture. Plant Cell Physiol., **14**, p. 1113-1120.

Ohira, K., Ojima, K., Saigusa, M., Fujiwara, A., 1975, Studies on the nutrition of rice cell cultures. II. Microelement requirement and the effects of dedeficiency. Plant Cell Physiol., **16**, p. 73-85.

Oswald, T.H., Nicholson, R.L., Bauman, L.F., 1977, Cell suspension and callus culture of somatic tissue of maize. Physiol. Plant., **41**, p. 45-51.

Owen, H.R., Miller, R.A., 1992, An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations. Plant Cell, Tissue Organ Cult., **28**, p. 147-150.

Ozias-Akins, P., Vasil, I.K., 1985, Nutrition of plant tissue cultures. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (ed. Vasil, I.K.), Vol. 2, Academic Press, London, p. 129-148.

Payne, G., Bringi, V., Prince, C., Shuler, M., 1991, *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Hanser Publishers, Munich.

Price, H.J., Smith, R.H., Grumbles, R.M., 1977, Callus cultures of six species of cotton (*Gossypium* L.) on defined media. Plant. Sci. Lett., **10**, p. 115-124.

Rhodes, M.J.C., 1985, Immobilized plant cell cultures, Top Enzyme Ferment. Biotechnol., **10**, p. 51-87.

Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., Frommer, W.B., 1992, Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. EMBO J., **11**, p. 4705-4713.

Ritterhaus, E., Ulrich, J., Westphal, K.,1990, Large-scale production of plant cell cultures. IAPTC Newslett, **61**, p. 2-10.

Robertson, G.H., Doyle, L.R., Sheng, P., Pavlath, A.E., Goodman, N., 1989, Diosgenin formation by freely suspended and entrapped plant cell cultures *of Dioscorea deltoidea*. Biotechnol. Bioeng., **34**, p. 1114-1125.

Rose, D., Martin, S.M., 1975, Effect of ammonium on growth of plant cells (*Ipomoea* sp.) in suspension cultures. Can. J. Bot., **53**, p. 1942-1949.

Ryu, D.D.Y., Lee, S.O., Romani, R.J., 1990, Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. Biotechnol. Bioengin., **35**, p. 305-311.

Sauer, N., Tanner, W., 1989, The hexose carrier from *Chlorella* cDNA cloning of a eucaryotic H^+-cotransporter. FEBS Lett., **259**, p. 43-46.

Sauer, N., Tanner, W., 1993, Molecular biology of sugar transporters in plants. Bot. Acta, **106**, p. 277-286.

Schäfer, G., Heber, U., Heldt, H.W., 1977, Glucose transport into spinach cloroplasts. Plant Physiol., **60**, p. 286-289.

Schellenbaum, P., Vantard, M., Peter, C., Fellous, A., Lambert, A.M., 1993, Co-assembly properties of higher plant microtubule-associated proteins with purified brain and plant tubulins. Plant J., **3**, p. 253-260.

Scragg, A.H., 1991 a, The immobilization of plant cells. In: *Plant Cell and Tissue Culture* (ed. Stafford, A., Warren, G.), Open University Press, Milton Keyness, p. 205 –219.

Scragg, A.H., 1991 b, Plant cell bioreactors. In: *Plant Cell and Tissue Culture* (ed. Stafford, A., Warren, G.), Open University Press, Milton Keyness, p. 220 –239.

Scragg, A.H., Flower, M.W., 1985, The mass culture of plant cells. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (ed. Vasil, I.K.), Vol. 2, Academic Press, London, p. 103-128.

Scragg, A.H., Creswell, R., Ashton, S., York, A., Bond, P., Flower, M.W., 1988, Growth and secondary product formation of selected *Catharanthus roseus* cell line. Enzyme Microb. Technol., **10**, p. 532-536.

Seabrook, J.E.A., 1980, Laboratory culture. In: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemical* (ed. Staba, E.J.), CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p. 1-20.

Singh, B.D., Harvey, B.L., Kao, K.N., Miller, R.A., 1972, Selection presure in cell populations of *Vicia hajastana* cultured *in vitro*. Can. J. Genet. Cytol., **14**, p. 65-75.

Singh, M., Krikorian, A.D., 1980, Chelated iron in culture media. Ann. Bot. (London), **46**, p. 807-809.

Skoog, F., Miller, C.O., 1957, Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., **11**, p. 118-131.

Skoog, F., Hamzi, H.Q., Azweykowska, A.M., Leonard, N.J., Carraway, K.L., Fujii, T., Helgeson, J.P., Loeppky, R.N., 1967, Cytokinins: structure/activity relationships. Phytochemistry, **6**, p. 1169-1192.

Smart, N.J., Flower, M.W., 1981, Effect of aeration on large-scale cultures of plant cells. Biotechnol. Lett., **3**, p. 171-176.

Staba, E.J., 1980, *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Stafford, A., 1991, Genetics of cultured plant cells. In: *Plant Cell and Tissue Culture*. (Ed. Stafford, A., Warren, G.), Open University Press, Milton Keyness, p. 25-47.

Steiner, R.Y., Adelberg, E.A., Ingraham, J.L., 1977, *General Microbiology*, 4th edn Macmillan, New York.

Street, H.E., King, P.J., Mansfield, K., 1971, Growth control in plant cell suspension cultures. In: *Les Cultures de Tissus Plantes, Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique*, Paris, **193**, p. 17-31.

Street, H.E., 1973, *Plant Tissue and Cell Culture*, Blackwell Scientific Publications, London .

Street, H.E., 1976, Applications of cell suspension cultures. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (ed. Reinert, J., Bajaj, Y.P.S.), Springer, Berlin, p. 649-669.

Street, H.E., 1977, *Plant Tissue Culture*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Stuart, R., Street, H.E., 1971, Studies on the growth in culture of plant cells. X. Further studies on the conditioning of culture media by suspensions of *Acer pseudoplatanus* L. cells. J. Exp. Bot., 72, p 96-106.

Suzuki, T., Yoshioka, T., Kato, Y., Fujita, Y., 1987, A new estimation method for plant cell viability by determining electron transport activity. Plant Cell Reports, **6**, p. 279-282.

Syono., K., Furuya, T., 1971, Effect of temperature on citokinin requirement of tobacco calluses. Plant Cell Physiol., **12**, p. 61-72.

Tanaka, H., Nishijima, F., Suwa, M., Iwamoto, T., 1983, Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures, Biotechnol. Bioeng., **25**, p. 2359-2370.

Tanaka, H., 1987, Large-scale cultivation of plant cells at high density: a review. Process Biochem., **22**, p. 106-113.

Tazawa, M., Reinert, J., 1969, Extracellular and intracellular chemical environments in relation to embryogenesis *in vitro*. Protoplasma, **68**, p. 157-173.

Thorpe, T.A., 1978, *Frontiers of Plant Tissue Cultures*, Calgary, Alberta.

Towill, L.E., Mazur, P., 1976, Osmotic shrinkage as a factor in freezing injury in plant tissue cultures. Plant Physiol., **57**, p. 290-297.

Tsay, Z.F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., Crawford, N.M., 1993, The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. Cell, **72**, p. 705-713.

Tulecke, W., Nickell, L.G., 1959, Production of large amounts of plant tissue by submerged culture. Science, **130**, p. 863-865.

van *Gulik*., Meijer, J.J., ten **Hoopen, H.J.G., Luyben, K.Ch.A.M., Libbenga, K.R.**, 1989, Growth of a *Catharanthus roseus* cell suspension culture in a modified chemostat under glucose-limiting conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol., **30**, p. 270-275.

Veliky, I.A., Martin, S.M., 1970, A fermentor for plant cell suspension cultures. Can. J. Microbiol., **16**, p. 223-234.

Verma, D., van **Huystee, R.**, 1971, Derivation, characteristics, and large scale culture of a cell line from *Arachis hypogea* L., cotiledons. Exp. Cell Res., **69**, p. 402-413.

Verma, D.C., Dougall, D.K., 1977, Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. Plant Physiol., **59**, p. 81-87.

Wagner, G., Vogelman, H., 1977, Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture, The International Association for Plant Tissue Culture* (ed. Thorpe, T.A.), Calgary, p. 69-177.

Wang, C.J., Staba, E., 1963, Peppermint and spearmint tissue culture. II. Dual carboy culture of spearmint tissues. J. Pharm. Sci., **52**, p. 1058-1062.

Wetherell, D.F., Dougall, D.K., 1976, Source of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiol. Plant., **37**, p. 97-101.

White, P..R., 1943, *Handbook of Plant Tissue Culture*, Jaque Cattell Press, Lancester.

White, P.R., 1951, Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. Ann. Rev. Plant Physiol., **2**, p. 231-244.

White, P.R., 1963, *The Cultivation of Animal and Plant Cells*, Ronald Press, New York.

Wilson, S.B., King, P.J., Street, H.E., 1970, Studies on the growth in culture of plant cells. XII. A versatile system for the large scale batch or continuous culture of plant cell suspensions. J. Exp. Bot., **22**, p. 177-207.

Wilson, G., 1976, A simple and inexpresive design of chemostat enabling steady-state growth of *Acer pseudoplatanus* L. cells under phosphate limited conditions. Ann. Bot., **40**, p. 919-932.

Wilson, G., Marron, P., 1978, Growth and anthraquinone biosynthesis by *Galium mollugo* cells in batch and chemostat culture. J. Exp. Bot., **29**, p. 837-851.

Wilson, G., 1980, Continuous culture of plant cells using the chemostat cultures. In: *Plant Cell Cultures* I (ed. Fiechter, A.), Akademie – Verlag, Berlin, p. 1-25.

Wink, M., 1993, The plant vacuole: a multifunctional compartment. J. Exp. Bot., **44**, Suppl., p. 231-246.

Withers, L.A., Street, H.E., 1977, Freeze preservation of cultured plant cells. III. The pregrowth phase. Physiol. Plant., **39**, p. 171-179.

Wolter, K.E., Skoog, F., 1966, Nutritional requirement of *Fraxinus* callus culture. Amer. J. Bot., **53**, p. 23-269.

Yasuda, S., Satoh, K., P.J., Ishii, T., Furuya, T., 1972, Studies on the cultural conditions of plant cell suspension culture, Ferment. technol. Today Proc. Int. Ferment. Symp., 4th, p. 697.

Yeoman, M.M., 1978, Bypassing the plant. Ann. Bot., **60**, p. 157-174.

Yeoman, M.M., 1987, Techniques, characteristics, properties, and commercial potential of immobilized plant cells. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (ed. Constabel, F., Vasil, I.K.) Vol.4, *Cell Culture in Phytochemistry*, Academic Press, San Diego, p. 197-215.

Yeoman, M.M., Lindsey, K., Miedzybrodzka, M.B., McLauchlan, W.R., 1982, Accumulation of secondary products as a facet of differentiationin plant cell and tissue cultures. In: *Differentiation In Vitro* (ed. Yeoman, M.M., Truman, D.E.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 65-82.

Yokoi, H., Koga, J., Yamamura, K., Seike, Y., Tanaka, H., 1993, High density cultivation of plant cells in a new aeration-agitation type fermentor, Maxblend Fermentor®. J. Ferment. Bioeng., **75**, p. 48-52.

Young, M., 1973, Studies on the growth in culture of plant cells. Nitrogen assimilation during nitrogen-limited growth of *Acer pseudoplatanus* L. cells in chemostat culture. J. Exp. Bot., **24**, p. 1172-1185.

Zenk, M.H., El-Shagi, H., Schulte, U., 1975, Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Planta Medica, Suppl., p. 79-101.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6. IZOLAREA ŞI CULTURA PROTOPLASTELOR VEGETALE

6.1. INTRODUCERE

Cultura în condiţii aseptice a celulelor vegetale s-a dovedit a fi o tehnică extrem de utilă şi valoroasă atât în studiul citodiferenţierii cât, mai ales, în experimentele de modificare genetică a plantelor cu importante consecinţe pentru dezvoltarea biotehnologiilor agricole. In ultimele trei decenii potenţialul culturilor de celule vegetale *in vitro* a crescut spectaculos prin dezvoltarea cercetărilor în domeniul izolării, culturii şi fuziunii protoplastelor vegetale, iar, în ultimul deceniu, perspectivele aplicării în biotehnologie au progresat incredibil prin dezvoltarea metodelor geneticii moleculare, prin transformare genetică şi analiza markerilor moleculari. La baza multora dintre tehnologiile ingineriei genetice vegetale se află un sistem experimental etrem de fragil şi pretenţios, protoplastul vegetal izolat (*Brezeanu* şi colab., 1988).

Protoplastele vegetale pot fi definite ca celule vegetale nude, lipsite de peretele celular de natură celulozo-pectică. Celulele nude reprezintă un sistem ideal pentru studiul dezvoltării plantelor, deoarece protoplastele sunt entităţi celulare capabile să-şi resintetizeze peretele celular, să se dividă şi, în condiţii de cultură corespunzătoare, să regenereze o nouă plantă. Mai mult, pe lângă posibilitatea de clonare, pornind de la o singură celulă, protoplastele asigură un material celular extrem de preţios în cercetările de mutageneză, de genetică a celulei somatice, în transformarea genetică, virusologie şi testarea toxicităţii unor compuşi *in vitro*. Protoplastele, provenind de la două specii diferite, imposibil de hibridat prin metodele sexuale, pot fi induse să fuzioneze şi să regenereze **hibrizi somatici** sau **cibrizi**, inexistenţi în natură. Prin utilizarea **subprotoplastelor** în experimentele de fuziune se pot obţine forme cibride, iar transferul organitelor deţinătoare de material genetic propriu - plastide, mitocondrii sau cromozomi – facilitează transferul parţial de informaţie genetică, care poate merge până la transferul unei singure gene, prin transformare genetică.

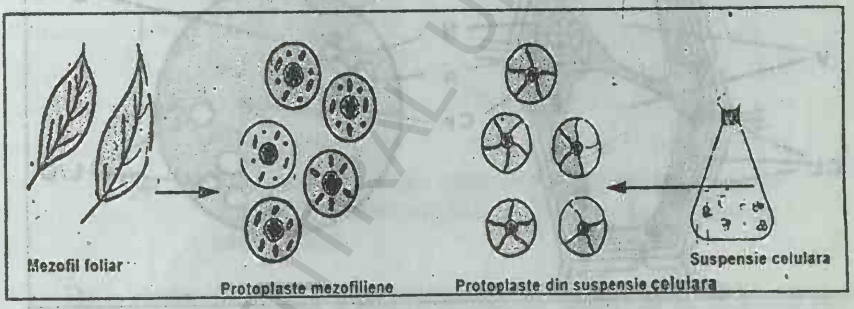
Utilizarea protoplastelor în experimentele de modificare genetică a plantelor depinde, însă, de parcurgerea unor etape esenţiale – izolarea şi cul-

tura cu succes a protoplastelor speciilor de interes şi respectiv, stabilirea unei metode eficiente de regenerare a plantelor, din protoplastele izolate. La acest nivel, sunt încă necesare cercetări laborioase, deoarece metodele de cultură sunt în mare măsură empirice, iar principalele grupe de plante, sub aspect economic, cerealele şi legumele s-au dovedit a fi printre plantele cele mai recalcitrante la cultura protoplastelor lor *in vitro*.

Deşi, din motive practice, importanţa protoplastelor pentru cercetările de modificare genetică a plantelor a fost recunoscută mai timpuriu, treptat s-au impus şi cercetările fundamentale în care protoplastele pot aduce un aport substanţial.

1. MORFOLOGIE
- **Structura şi biosinteza peretelui celular**
- **Structura membranei**
- **Structura organitelor**

2. FIZIOLOGIE
- **Fotosinteză**
- **Absorbţie**
- **Biochimie**



3. GENETICA
- **Fuziune celulară**
- **Transfer de AND**
- **Transfer de organite.**

4. PATOLOGIE
- **Infecţie virală**
- **Patotoxine**

5. DIFERENTIERE
- **Morfogeneză**
- **Embriogeneză**

Fig. 71. Principalele surse de izolare a protoplastelor vegetale şi aplicaţiile lor în cercetările de biologie celulară

Astfel, protoplastele pot reprezenta un sistem experimental extrem de valoros, pentru cercetările de biologie celulară (*Rakosy-Tican* şi *Soran*, 1988), cum ar fi: studiul resintetizei peretelui celular, cercetări asupra permeabilităţii membranei şi transportului membranar, cercetări de fiziologie la nivel celular, mecanismul de acţiune a unor fitohormoni, fotosinteza, rolul

fitocromului, totipotenţialitatea şi procesele de embrio sau organogeneză, studiul virusurilor şi al mecanismului lor de acţiune la nivel unicelular, aspecte de citologie şi biochimie, mai uşor de abordat la nivel unicelular etc. (fig. 71).

Astfel de studii, depind, de asemenea, de izolarea în cantitate mare a unor protoplaste cât mai uniforme şi viabile.

6.2. IZOLAREA PROTOPLASTELOR VEGETALE

Celula vegetală, spre deosebire de cea animală este înconjurată de un perete celular având o structură complexă (fig. 72 şi 73).

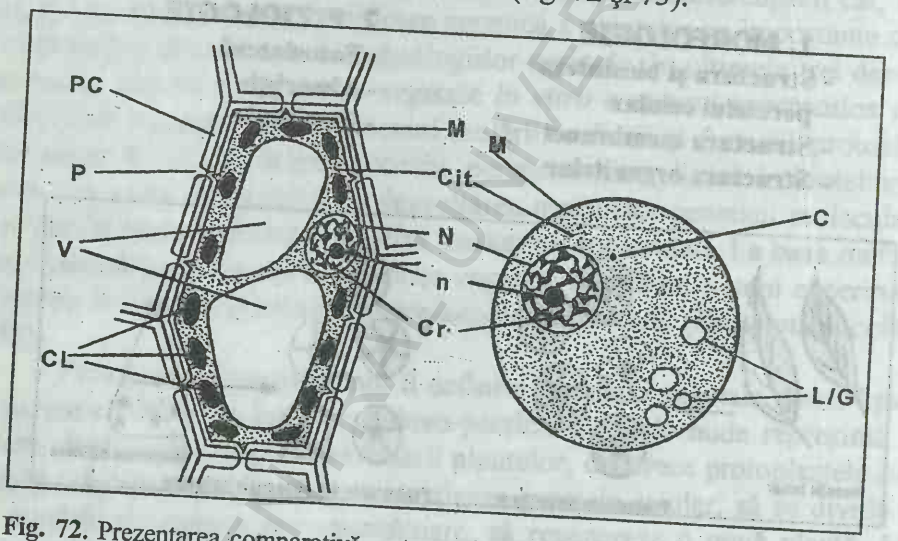


Fig. 72. Prezentarea comparativă a structurii celulei vegetale (stânga) şi animale (dreapta), văzută la microscopul optic: PC = perete celular; P = plasmodesme; V= vacuola; CL = cloroplaste; M = membrana plasmatică; Cit = citoplasma; N = nucleu; n = nucleol; Cr = cromatina; C= centrozom; L/G= picături lipidice (sau glicogen)

Comparativ cu celula animală, cea vegetală mai deţine ca organite caracteristice plastidele şi sistemul vacuolar fiind totodată lipsită de centrozom (fig. 72). Peretele celular este alcătuit dintr-o lamelă mijlocie de natură pecto-proteică, flancată de structuri formate din fibrile de celuloză (fig. 73a şi 73b). Lamela mijlocie se formează încă în faza de diviziune celulară o dată cu apariţia fragmoplastului. Procesul de consolidare a peretelui celular care desparte cele două celule fiice, apărute prin mitoză, începe înainte ca fragmoplastul să ia contact cu pereţii laterali ai celulei mamă.

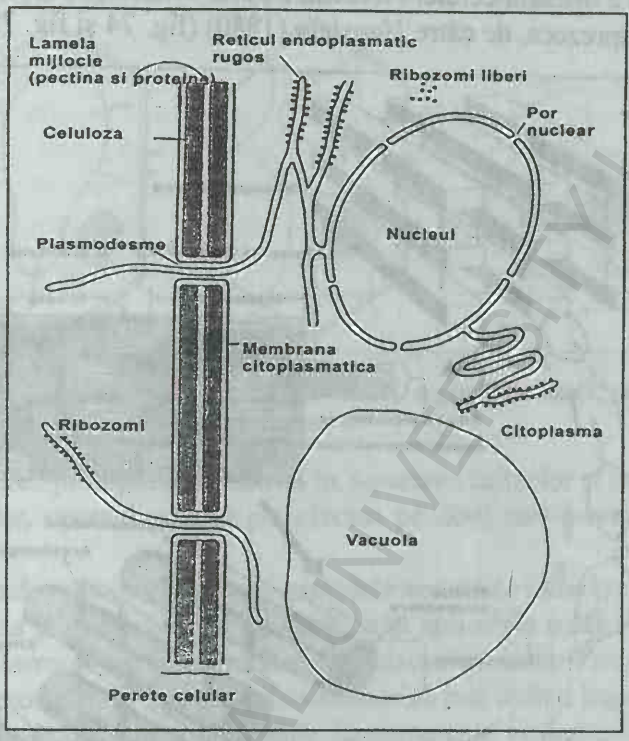


Fig. 73a. Imagine de detaliu reprezentând structura peretelui celular al celulei vegetale şi spaţiile de comunicare intercelulară

De o parte şi de alta a lamelei mijlocii încep să se depună polizaharide transportate de veziculele aparatului *Golgi* şi încep să se formeze microfibrile de celuloză.

Pereţii celulari tineri nu sunt structuri rigide permiţând creşterea celulei în lungime şi în volum. In această etapă de creştere celulară peretele celular este denumit perete celular primar. In momentul în care celula îşi încetează creşterea peretele celular se îngroaşă prin apoziţie, devenind perete celular secundar.

Celulele care suferă modificări secundare ale pereţilor celulari nu mai pot fi utilizate pentru izolarea protoplastelor. Componentele de bază ale peretelui celular sunt: celuloza, substanţele pectice, hemiceluloza şi lignina. Raportul între aceste substanţe de bază variază, în funcţie de specie, în ţesuturile tinere sau mature – dăm câteva exemple în tabelul 19. Experimental, peretele celular poate fi îndepărtat obţinându-se celule înconjurate numai de membrana plasmatică (plasmalema) şi având formă sferică – for-

ma primitivă a oricărei celule. Acestea, au fost denumite protoplaste, încă în secolul nouăsprezece, de către *Hanstein* (1880) (fig. 74 şi fig. 75).

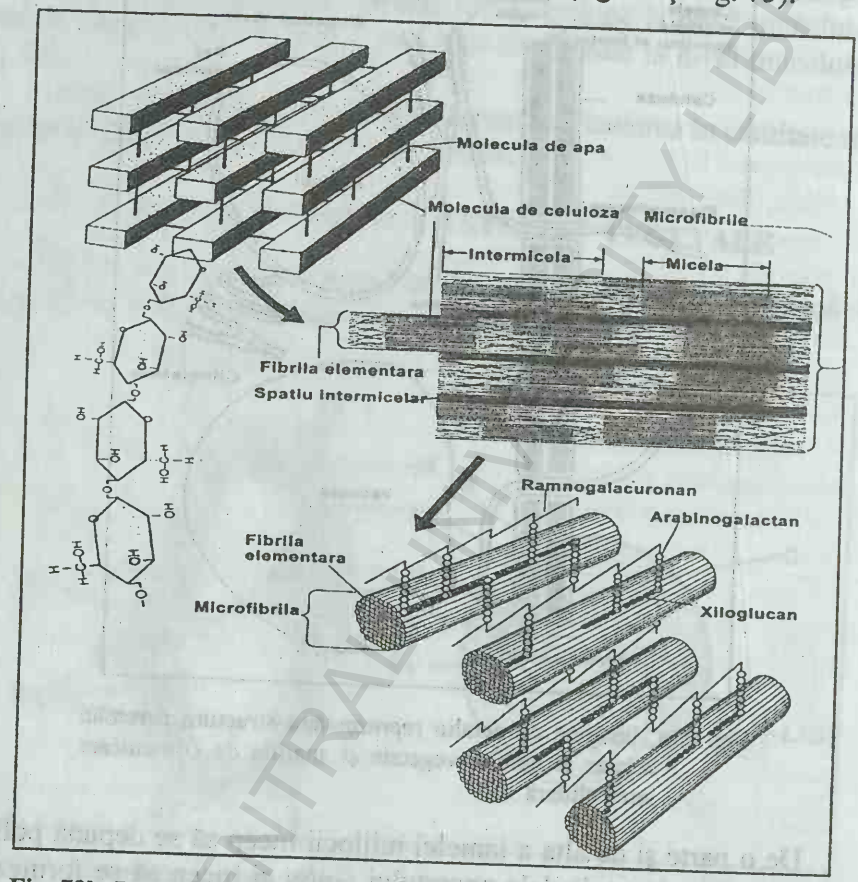


Fig. 73b. Reprezentarea structurii fibrelor de celuloza care intra în alcatuirea peretelui celular

Tabelul 19. Compoziţia peretelui celular în ţesuturi tinere sau mature de grâu, ovăz, floarea soarelui şi două specii de arbori (*Hall* şi colab., 1974 – adaptat)

	% din substanţa uscată – ţesuturi tinere			% din substanţa uscată – ţesuturi mature			
	Ovăz-coleoptil	Grâu-coleoptil	Floarea soarelui hiocotil	Pai de grâu	Pai de ovăz	Lemn de duglas	Lemn de mesteacăn
Celuloză	42	36	38	39	44	57	44
Hemiceluloză	38	30	8	32	32	14	24
Substanţe pectice	8	13	46	1	1	-	-
Lignină	-	-	8	17	19	28	22

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

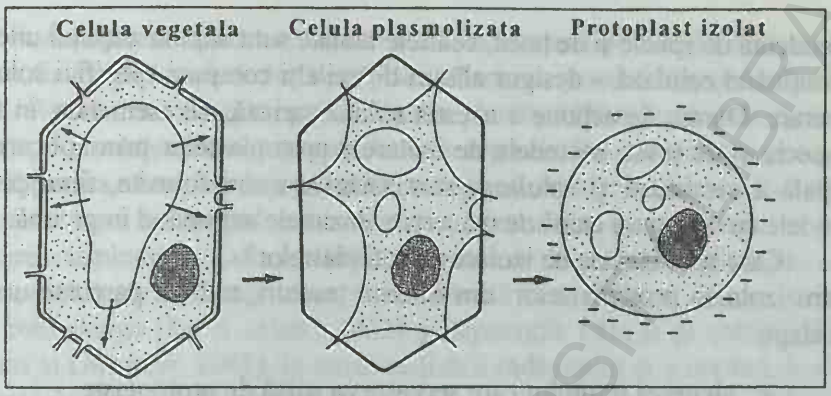


Fig. 74. Reprezentarea schematică a celulei vegetale, a celulei plasmolizate, respectiv a protoplastului izolat

Izolarea protoplastelor constă în separarea celulelor şi îndepărtarea peretelui celular, operaţii care se pot efectua pe două căi: **mecanică** sau **enzimatică**.

Primele metode de izolare, ***metodele mecanice*** (*Klerker*, 1892), bazate pe plasmoliza şi microdisecţia celulelor, sunt aplicabile numai acelor ţesuturi care pot fi plasmolizate cu uşurinţă, dar randamentul izolării este foarte scăzut. Astfel de metode, fiind extrem de laborioase, au mai mult o importanţa istorică folosindu-se, astăzi, numai în studiile fundamentale vizând evitarea efectelor nocive ale preparatelor enzimatice şi produşilor rezultaţi din degradarea enzimatică a peretelui celular (*Pilet* şi colab., 1972).

Prima ***metodă enzimatică*** de izolare a protoplastelor a fost aplicată de către Cocking, în anul 1960, care a reuşit - folosind un amestec de celulază şi pectinază - să izoleze un număr mare de protoplaste, din pericarpul fructelor de tomate. Dezvoltarea metodelor enzimatice de izolare a protoplastelor, care permite izolarea a aproximativ 1.000.000 protoplaste din 1 g de ţesut vegetal, a deschis noi posibilităti de investigare atât în biologia celulară şi în fiziologia vegetală, cât mai ales în ceea ce se numeşte astăzi biotehnologia protoplastelor vegetale şi ingineria genetică. Metodele enzimatice de izolare a protoplastelor, sunt utilizate actualmente, în majoritatea laboratoarelor, deoarece ele asigură obţinerea unor populaţii mari de protoplaste, cu viabilitate crescută. In general, pentru izolarea protoplastelor vegetale se utilizează o **pectinază** şi o **celulază**, aplicate fie secvenţial, fie împreună. Metodele secvenţiale de izolare a protoplastelor constau în tratarea ţesuturilor, mai întâi cu o soluţie conţinând pectinază (alături de un stabilizator osmotic şi de alţi compuşi cu rol stimulator – săruri, tampon de pH etc.); după durata optimă de macerare a lamelei mijlocii,

dependentă de specie şi de ţesut, celulele izolate sunt supuse acţiunii unei soluţii conţinând celulază – desigur alături de ceilalţi compuşi specifici soluţiei de macerare. Durata de acţiune a acestei soluţii variază, de asemenea, în funcţie de specie şi de ţesut. Metodele de izolare a protoplastelor prin aplicarea secvenţială a pectinazei şi celulazei sunt astăzi arareori folosite, fiind preferate metodele cu o singură etapă de macerare, enzimele acţionând împreună.

Care sunt etapele de izolare a protoplastelor?

Pentru izolarea protoplastelor, din diferite ţesuturi, trebuie parcurse următoarele etape:

- alegerea ţesutului care serveşte ca sursă de protoplaste
- pretratamente (opţional)
- sterilizarea materialului vegetal – pentru plantele crescute *ex vitro*
- pregătirea ţesutului pentru izolare: secţionare, îndepărtarea epidermei, lezarea epidermei etc.
- preplasmoliza
- aplicarea soluţiei de macerare
- incubarea ţesutului în soluţia de macerare
- purificarea protoplastelor
- stabilirea numărului şi a viabilităţii protoplastelor

In cele ce urmează vom discuta, pe rând, aceste etape şi care sunt factorii care intervin în fiecare dintre ele.

Alegerea materialului vegetal care va servi ca sursă de protoplaste: nu toate organele sau ţesuturile plantelor pot fi utilizate pentru izolarea protoplastelor. In primul rând trebuie alese acele organe sau ţesuturi ale căror celule au pereţi celulari primari, fără îngroşări secundare, alcătuiţi mai ales din celuloză. De aceea, plantele cultivate în câmp nu reprezintă o sursă potrivită pentru izolarea protoplastelor. Se pot utiliza plante crescute în condiţii controlate, în seră sau *in vitro*. Actualmente, se consideră că sursele cele mai potrivite pentru izolarea protoplastelor sunt organele şi ţesuturile recoltate de la plantule tinere, provenite din seminţe germinate în condiţii controlate, sau plantele micropropagate *in vitro*, sau chiar celulele provenind din suspensii celulare.

Pentru diferite specii de plante, sursele cel mai frecvent utilizate pentru izolarea de protoplaste totipotente sunt: mezofilul foliar, hipocotilele sau cotiledoanele şi suspensiile celulare; mai rar, pot fi utilizate ca surse de izolare a protoplastelor: rădăcinile, calusul, petalele, tuberculii, ţesuturi ale fructului sau grăuncioarele de polen. In cel din urmă caz, se vor obţine protoplaste haploide.

Sursa optimă de izolare a protoplastelor variază în funcție de specie și de starea fiziologică a plantelor sursă, dar, uneori ea poate fi dependentă și de genotip. Astfel, de exemplu, pentru multe plante, îndeosebi pentru speciile lemnoase, plantulele micropropagate *in vitro* reprezintă sursa cea mai potrivită pentru obținerea unor populații mari de protoplaste, relativ uniforme. Rezultate foarte bune s-au înregistrat prin utilizarea plantulelor tinere, obținute prin germinarea semințelor (*Davey*, 1983). Pornind de la astfel de plantule, s-au obținut protoplaste cu totipotențialitate crescută din: rădăcini (*Xu* și colab., 1981), cotiledoane (*Lu* și colab., 1982) și hipocotile (*Ahuja* și colab., 1983; *Glimelius* și *Ottosson*, 1983). In cazul utilizării rădăcinilor și a cotiledoanelor, cantitatea de protoplaste izolate este mai mică, comparativ cu folosirea mezofilului foliar. Hipocotilul s-a dovedit a fi o sursă de protoplaste cu o rată de creștere și cu o capacitate regenerativă superioare protoplastelor mezofiliene, la unele *Brasicaceae* (*Glimelius*, 1984), la cartof (*Dai* și colab., 1987) sau la floarea soarelui (*Fischer* și colab., 1992, *Krasnyanski* și *Menczel* 1993, *Rakosy-Tican* și colab., 1998).

Pretratamente (opțional): starea fiziologică a materialului vegetal, utilizat ca sursă de izolare a protoplastelor, influențează, în mare măsură, atât cantitatea, cât și viabilitatea și capacitatea regenerativă a acestora. Indeosebi, la leguminoase, diferite pretratamente aplicate țesuturilor sursă s-au dovedit a fi utile în creșterea calității protoplastelor. Astfel, menținerea plantelor la întuneric, timp de câteva ore, înaintea izolării (*Constabel* și colab., 1973; *Johnson* și colab., 1981), utilizarea unor condiții de creștere stimulative (*Kao* și *Michayluk*, 1980), tratarea explantelor cu aminoacizi (*Zieg* și *Outka*, 1980) sau menținerea plantelor la temperaturi scăzute (*Saxena*, 1985), au îmbunătățit randamentul izolării protoplastelor. In cazul utilizării suspensiilor celulare ca sursă de izolare a protoplastelor, creșterea concentrației de auxină, în particular a 2,4-D (acidul 2,4 - diclorfenoxiacetic), în mediul de cultură, sau înfometarea în zaharoză, sunt măsuri care conduc la creșterea cantității de protoplaste izolate (*Thorpe*, 1978).

Sterilizarea – pentru plantele crescute ex vitro: dacă plantele utilizate pentru izolarea protoplastelor provin din seră sau laborator, înainte de izolare, țesuturile folosite trebuie sterilizate prin aplicarea unor soluții bactericide (hipoclorit de sodiu sau de calciu, detergenți care conțin hipoclorit – de exemplu Domestos). Durata tratamentului de sterilizare și concentrația soluțiilor utilizate variază în funcție de specie și de țesut, căutându-se varianta de tratament care elimină contaminanții bacterieni și fungici fără a afecta viabilitatea țesuturilor. După sterilizare, țesuturile se spală de mai multe ori cu apă sterilă, următoarele operații desfășurându-se în condiții aseptice.

Pregătirea țesutului pentru izolare: secționare, îndepărtarea epidermei, lezarea epidermei: pentru a facilita pătrunderea soluției enzimatice în țesuturi, acestea trebuie secționate. Astfel, frunzele vor fi secționate în fragmente transversale, sau în fragmente înguste, de o parte și de alta a nervurii principale; frunzele cu lamină alungită, la cereale de exemplu, sunt secționate în fragmente longitudinale, înguste. Hipocotilele se secționează, de asemenea, în fragmente longitudinale lungi și înguste. Uneori, pentru a reduce stresul de rănire, frunzele sunt ușor lezate, prin trecerea lor pe o suprafață abrazivă. O altă modalitate de a facilita pătrunderea soluției de macerare constă în îndepărtarea epidermei inferioare a frunzei și plasarea laminei, cu fața jupuită în jos, pe suprafața soluției de enzime. Această metodă fiind laborioasă se aplică doar la câteva specii a căror epidermă se îndepărtează ușor (*Petunia* – plante crescute în seră). Suspensiile celulare, provenind din mediul aseptic, nu necesită sterilizare, dar agregatele celulare trebuie separate de mediul de cultură lichid, fie prin centrifugare, fie prin aspirarea mediului. După îndepărtarea mediului de cultură, acesta este înlocuit cu soluția de macerare.

Preplasmoliza: mai ales în cazul țesuturilor foliare, cotiledonare sau de hipocotile, se aplică un tratament de plasmolizare, anterior aplicării tratamentului cu soluția de macerare. In mod obișnuit, se utilizează o soluție de stabilizator osmotic, având aceeași osmolaritate ca și soluția de macerare. Preplasmoliza asigură și un mediu propice pentru țesuturi, pe perioada de pregătire a acestora pentru izolare, prevenind dezhidratarea, pe parcursul secționării. Adeseori, însă, fragmentele de țesut sunt transferate direct în soluția de macerare, fără preplasmoliză.

Aplicarea soluției de macerare: oricare ar fi solția de macerare, aceasta trebuie să conțină următoarele componente de bază:

- **celulază** – cel mai frecvent se utilizează Cellulase Onozuka R-10
- **pectinază** – mai frecvent utilizată este Macerozyme Onozuka R-10
- **stabilizator osmotic** în concentrație izoosmolară
- săruri de calciu, sau soluții complexe de săruri (chiar medii de cultură diluate) – pentru stabilizarea plasmalemei.

Compoziția soluției de macerare și concentrația diferitelor componente se adaptează pentru fiecare sursă de izolare a protoplastelor, în parte. Prezența celulazei și a pectinazei este esențială pentru macerarea laminei mijlocii și a fibrelor de celuloză ce alcătuiesc peretele celular. Extinderea utilizării protoplastelor vegetale, ca sisteme experimentale, în cercetările de biologie celulară și moleculară și, mai ales, în cele de inginerie genetică vegetală, a determinat apariția pe piața mondială de reactivi de laborator, a o serie de produse enzi-

matice, cu eficacitate mare, extrase din culturi de ciuperci sau bacterii (tabelul 20 - *Ishii*, 1989). Melcul de grădină (*Helix pomatia)*, a fost, de asemenea, utilizat ca sursă de hemicelulaze; în perioada de pionierat, sucul gastric de melc - în stare brută – a fost direct utilizat pentru izolarea protoplastelor.

Preparatele enzimatice comerciale conţin, în general, alături de substanţa activă şi alţi compuşi, cum ar fi: unele săruri, fenoli şi unele enzime de tipul ribonucleazelor şi proteazelor, care pot afecta viabilitatea protoplastelor.

Tabelul 20. Enzimele utilizate în mod curent pentru izolarea protoplastelor vegetale (după *Ishii*, 1989)

Enzima	Organism producător	Sursa comercială
CELULAZE Cellulase Onozuka R-10	*Trichoderma viride*	Yakult Honsha Co., Tokyo, Japonia
Cellulase Onozuka RS	*Trichoderma viride*	Yakult Honsha Co., Tokyo, Japonia
Meicelase P-1	*Trichoderma viride*	Meiji Seika Kaisha Tokyo, Japonia
Driselase	*Irpex lacteus*	Kyowa Hakko Kogyo, Tokyo, Japonia
Cellulase YC	*Trichoderma viride*	Seishin Pharmaceutical Co,Tokyo
Cellulysin	*Trichoderma viride*	Calbiochem, San Diego,CA, SUA
Cellulase CEL	*Trichodermaviride*	Cooper Biomedical Inc., Malvern, PA, SUA
HEMICELULAZE Helicase	*Helix pomatia*	Ind.Biol.Franc., Gennevilliers, Franţa
Hemicellulase	*Aspergilus niger*	Sigma Chemical Co.,St. Louis,MO, SUA
Rhozyme HP150	*Aspergilus niger*	Genencor Inc.,South San Francisco, CA, SUA
PECTINAZE Macerozyme R-10	*Rhizopus arrhizus*	Yakult Honsha Co., Tokyo, Japonia
Pectolyase Y-23	*Aspergillus japonicus*	Seishin Pharmaceutical Co,Tokyo
Macerase	*Rhizopus arrhizus*	Calbiochem, San Diego,CA, SUA
PATE	*Bacillus polymyxa*	Farbwerke-Hoechst AG,Frankfurt, Ger.

De aceea, adeseori, este necesară fie o centrifugare prealabilă a soluţiei enzimatice, fie o purificare a preparatelor enzimatice crude. Centrifugarea la o turaţie de 4000 rpm, duce la depunerea particulelor rămase în suspensie şi uşurează, totodată, sterilizarea prin filtrare, astfel de particule putând colmata

porii de 0,2 μm ai filtrelor Millipore. Purificarea preparatelor enzimatice comerciale, se realizează, în unele laboratoare, prin trecerea lor prin coloane scimbătoare de ioni. Expunerea celulelor la acțiunea preparatelor enzimatice, pentru o perioadă cât mai scurtă de timp (*Hayashi* și *Nakajima*, 1984) este, de asemenea, o modalitate de a reduce efectele nocive ale compușilor amintiți.

Cu toată gama largă de preparate enzimatice comerciale, unii cercetători preferă să obțină enzimele în laboratorul propriu. Așa, de exemplu, *Engler* și *Grogan* (1983), au obținut printr-un procedeu fermentativ, un complex enzimatic pe care l-au denumit "wallase". Mai mult, s-a sugerat posibilitatea utilizării unui complex enzimatic specific unei anumite specii sau țesut, prin cultivarea unei suspensii de mucegaiuri, cum ar fi cele de *Penicillium citreo-viride*, pe substratul care urmează a fi folosit pentru izolarea protoplastelor.

Unii autori preferă utilizarea unei singure enzime, cum este driselase, care are atât activitate celulazică, cât și pectinazică. Dacă se utilizează un amestec de celulaze și pectinaze, se obțin rezultate mai bune prin aplicarea metodei cu o singură treaptă, comparativ cu metoda secvențială.

Un amestec enzimatic, potrivit pentru o anumită specie sau organ, poate fi necorespunzătoare pentru alte specii și organe. De aceea, în majoritatea laboratoarelor, se stabilesc rețete standard pentru izolarea de rutină a protoplastelor. De exemplu, amestecul de 5% Meicelase (celulază) și 0,5% Macerozyme (pectinază) este utilizat pentru izolarea protoplastelor din mezofilul foliar al plantelor "model" *Nicotiana tabacum* și *Petunia hybrida* (*Power* și *Davey*, 1979). O altă combinație frecvent utilizată pentru izolarea protoplastelor mezofiliene este: 1% Cellulase Onozuka R-10 și 0,5 % Macerozyme. Diverse variante de soluții de macerare, potrivite pentru diferite grupe de plante, sunt recomandate de către Power și Davey (1990). Pentru a preveni situațiile neprevăzute, când un preparat enzimatic dispare de pe piață, sau un eșantion de enzime devine inactiv, este bine să se testeze și alte combinații de enzime, decât cele utilizate pentru izolările curente. Un preparat enzimatic foarte activ, apărut relativ recent, este Pectolyase Y-23. Acesta a fost folosit, cu succes, pentru izolarea protoplastelor la unele plante, pentru care alte amestecuri enzimatice au fost ineficiente - frunze și cotiledoane de *Glycine max* (*Schwenk* și colab., 1981), plantule de *Medicago disciformis* și de *M. lupulina* (*Johnson* și colab., 1982).

La mediul de izolare, alături de una sau mai multe enzime celulozolitice și pectinolitice, se mai adaugă un stabilizator osmotic, absolut necesar pentru păstrarea integrității și a stabilității protoplastelor, în absența peretelui celular. Ca stabilizatori osmotici se utilizează, cel mai frecvent, manitolul sau

sorbitolul. Zaharoza este, de asemenea, adeseori, folosită ca stabilizator osmotic, în soluția de macerare. Mai recent, s-a testat și eficiența unor stabilizatori preponderent minerali, alcătuiți din săruri, cum ar fi clorura de potasiu (*Müller* și *Ryschka*, 1987), sulfatul de magneziu (*Wichers* și colab., 1984), sau amestecuri de săruri – de exemplu soluția CPW (*Frearson* și colab., 1973). Studiile bazate pe determinarea viabilității protoplastelor, pe seama unor coloranți vitali, au relevat faptul că sulfatul de magneziu și sorbitolul mențin cel mai bine viabilitatea protoplastelor mezofiliene, la unele specii de cereale (*Mathe* și *Rakosy-Tican*, 1991). De asemenea, pentru creșterea stabilității membranei plasmatice se adaugă, în general, la mediul de izolare, ioni de Ca^{++} sau, mai rar de Mg^{++}. Viabilitatea protoplastelor poate fi îmbunătățită și prin adăugarea la mediul de izolare a unor soluții de săruri minerale sau a unui mediu de cultură. Stabilitatea protoplastelor crește prin suplimentarea soluției de macerare cu dextransulfat, al cărui efect benefic este atribuit adsorbției fenolilor (*Davey*, 1983) sau cu acid ascorbic; pH-ul mediului de izolare se ajustează la valori cuprinse între 5,2 - 6,0. Deși, mulți cercetători nu adaugă soluții tampon de pH, la mediul de izolare a protoplastelor, totuși, uneori, se folosesc substanțe tampon, cum ar fi MES (acidul 2-N morfolinoetansulfonic) (*Shepard*, 1980; *Saxena* și colab., 1982).

Pentru a facilita pătrunderea soluției de macerare în țesuturi se aplică, adeseori, o infiltrare la vid a fragmentelor tisulare aflate în soluția de macerare, metodă eficientă mai ales în cazul țesuturilor acoperite cu trihomi, formațiuni epidermale care impiedică accesul soluției până la nivelul țesuturilor țintă.

Incubarea țesuturilor în soluția de enzime se face la întuneric, sau la lumină difuză, la o temperatură cuprinsă între 25^0C - 30^0C, timp de câteva ore (între 2 și 20 de ore). Durata optimă de incubare a țesuturilor în soluția de enzime și condițiile cele mai potrivite, se stabilesc prin tatonare. Cel mai adesea, se utilizează un tratament de incubare la temperatura camerei (20^0C - 25^0C), timp de 16 ore ("overnight"). In unele cazuri, expunerea la lumină, pe parcursul incubării țesuturilor în soluția de macerare, s-a dovedit stimulativă pentru izolarea protoplastelor (de exemplu: la petunie - *Binding*, 1974; la cartof – *Rakosy-Tican*, 1991). De asemenea, agitarea pe un agitator orbital, la o turație mică (30 – 60 rpm), poate crește randamentul de izolare a protoplastelor. Dacă se utilizează enzime cu activitate mare de macerare și țesuturi tinere, durata de incubare în soluția de macerare se poate reduce la 2 - 3 ore. Creșterea temperaturii până la 40^0C poate reduce durata de incubare a țesuturilor în soluția de macerare. Durata optimă, de incubare a diverselor țesuturi în soluția de macerare, se stabilește prin observare la microscopul inversat (de exemplu Olympus CK2), urmărindu-se gradul de macerare a

țesutului și numărul de protoplaste sferice eliberate (fig. 75). Forma, structura protoplastelor și lipsa peretelui celular pot fi evidențiate și prin studii de microscopie electronică; astfel, prin utilizarea microscopiei electronice cu transmisie se evidențiază ultrastructura caracteristică protoplastelor diferitelor specii de plante (fig. 76, și fig.77 A și B).

Purificarea protoplastelor: atât în experimentele de biologie celulară, cât mai ales în cele de hibridare somatică și transformare genetică, este important să se izoleze populații mari de protoplaste având puritate crescută.

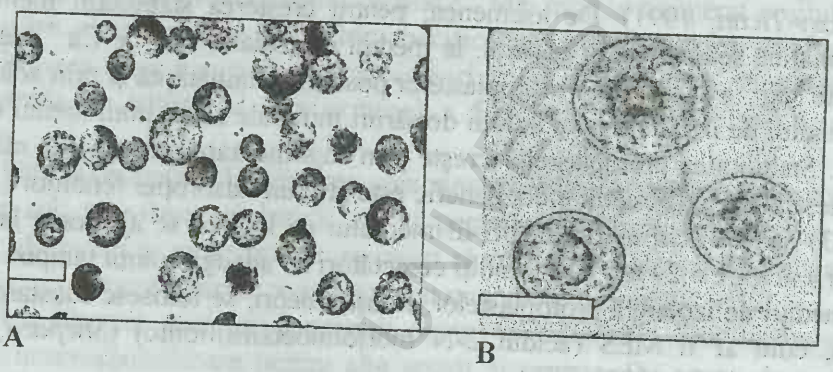


Fig. 75. Imaginea microscopică a protoplastelor izolate prin metode enzimatice: A – protoplaste mezofiliene de cartof; B – protoplaste izolate din suspensii celulare de *Nicotiana africana* (bara = 40 μm)

Metodele de purificare cel mai mult utilizate sunt filtrarea suspensiei de protoplaste, conținând resturi celulare și țesuturi nedigerate, prin filtre de nylon sau metalice sau centrifugarea lor folosind un gradient de zaharoză sau Ficoll. Purificarea protoplastelor cuprinde, de fapt, mai multe etape și este dependentă de stabilizatorul osmotic utilizat. In prima etapă, se urmărește separarea protoplastelor de resturile de țesuturi nedigerate sub acțiunea amestecului enzimatic, cum ar fi: țesuturi conducătoare, fragmente de țesut sau celule. Aceasta se realizează prin filtrarea suspensiei prin site de nylon sau metalice, sau chiar prin trecerea printr-o coloană de vată hidrofilă. După îndepărtarea resturilor grosiere, nedigerate, se urmărește spălarea protoplastelor de soluția de macerare și separarea lor de resturile celulare. Aceste obiective sunt atinse prin aplicarea unor centrifugări repetate. In funcție de stabilizatorul osmotic utilizat, se pot aplica 2 centrifugări, pentru spălarea soluției de macerare, urmate de o centrifugare pentru separarea protoplastelor de resturile celulare, sau centrifugările se pot aplica și în ordine inversă (fig. 78).

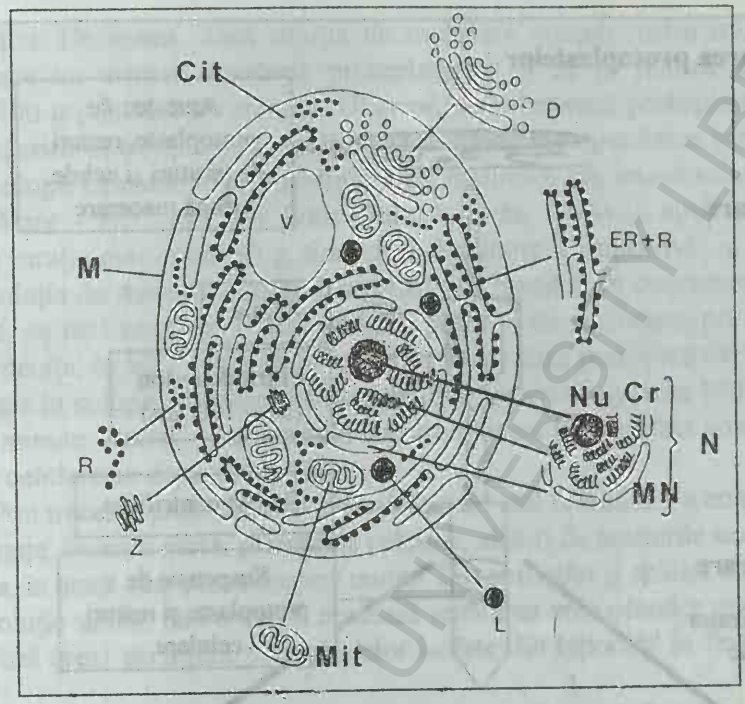


Fig. 76. Reprezentarea schematică a ultrastructurii protoplastului izolat: M = membrana celulară; Cit = citoplasma; D = dictiozom; ER+R = reticol endoplasmatic rugos; N = nucleu; Nu = nucleol; Cr = cromatina; MN = membrana nucleară; L= incluziune lipidică; Mit = mitocondrie; Z = zona centrozomică; R = ribozomi; V = vacuolă

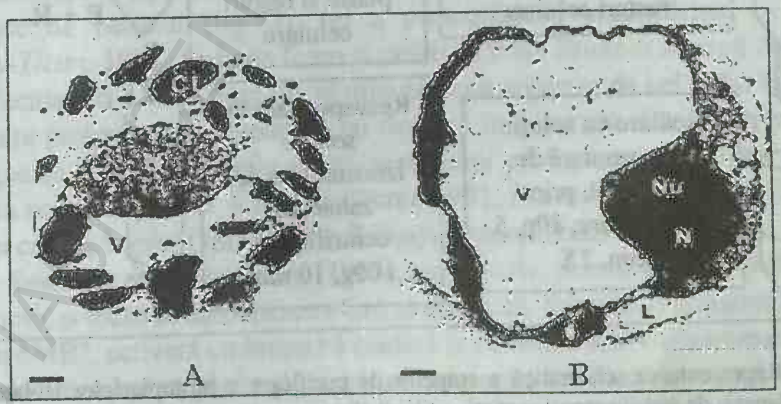


Fig. 77. Imagini reprezentand ultrastructura protoplastelor izolate: A – ultrastructura protoplastului izolat din mezofil foliar de cartof (*Solanum tuberosum* L.); B – ultrastructura protoplastului izolat din suspensii celulare de *Nicotiana africana*. CL= cloroplast; L = leucoplast; N = nucleu; Nu = nucleol; V = vacuolă (bara = 2 μm)

BCU IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

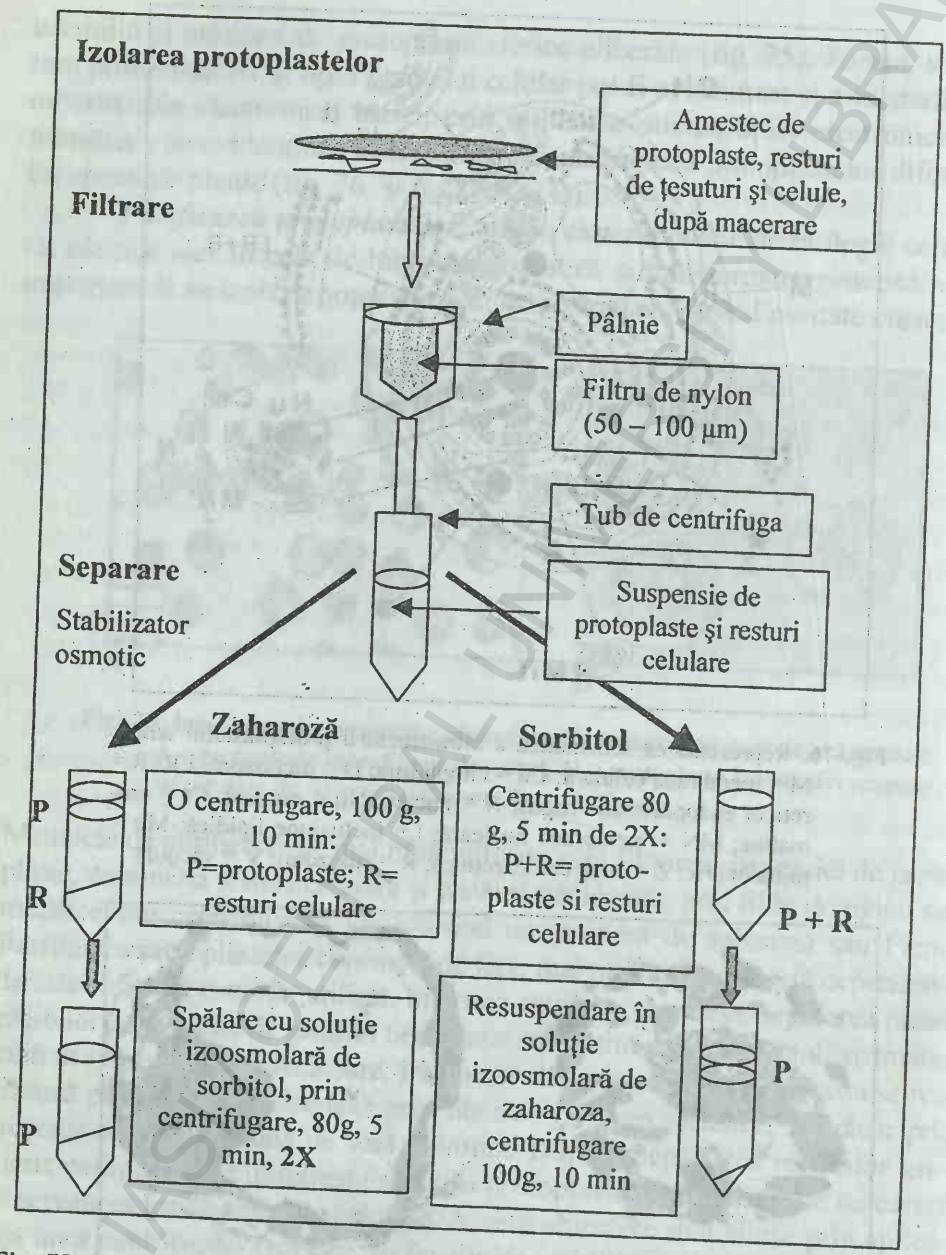


Fig. 78. Reprezentarea schematică a etapelor de purificare a protoplastelor izolate în funcție de stabilizatorul osmotic utilizat (P= protoplaste; R= reziduu)

De obicei, pentru separarea protoplastelor se utilizează o soluție izo-osmolară de zaharoză, în care protoplastele plutesc și se vor separa la supra-

fața soluției. De aceea, dacă soluția de macerare conține zaharoză, prima centrifugare va urmări separarea protoplastelor și se va realiza la aproximativ 100 g pentru 5-10 minute. Ulterior, se colectează protoplastele din stratul superior al soluției și se spală, de 2 ori, prin resuspendarea protoplastelor în soluție izoosmolară de sorbitol (sau manitol), sau într-o soluție salină de spălare – W5 sau CPW (vezi *Rakosy-Tican*, 1998) și, apoi, centrifugare la o turație mai mică, 80 g, timp de 3-5 minute. Dimpotrivă, în situația în care soluția de macerare conține sorbitol sau manitol, în concentrație izoosmolară, se realizează mai întâi spălarea soluției de macerare, prin centrifugări repetate, la 80 g timp de 3-5 minute, după care protoplastele sunt resuspendate în soluție izoosmolară de zaharoză și centrifugate la 100 g, timp de 5-10 minute. Astfel, protoplastele integre plutesc la suprafața soluției, iar resturile celulare se depun (fig. 78).

Prin trecerea protoplastelor pe coloana de vată hidrofilă s-a constatat că sunt reținute, în mare parte, și resturile celulare, alături de țesuturile nedigerate. De aceea, în acest caz, sunt necesare numai 2 centrifugări și spălări cu sorbitol sau cu soluție salină, fără a mai fi necesară separarea protoplatelor prin flotare în zaharoză (vezi exemplul protoplastelor izolate din hipocotil la floarea soarelui).

Wichers și colaboratorii (1984), au comunicat rezultate foarte bune pentru purificarea protoplastelor izolate din calus de *Symphytum officinale*, folosind sulfat de magneziu 0,7 M. Același stabilizator osmotic s-a utilizat, cu deosebit succes, pentru separarea protoplatelor mezofiliene de cereale, și a celor mezofiliene de petunia, precum și a celor obținute din suspensii celulare albinotice de petunie (fig.79), ori a protoplastelor mezofiliene de tutun (*Rakosy-Tican*, 1996; *Rakosy-Tican* și colab., 1998). Printr-o singură centrifugare, efectuată la 150 g, timp de 30 minute, sunt separate de cel puțin două ori mai multe protoplaste, comparativ cu flotarea în zaharoză. Mai mult, sulfatul de magneziu are efect benefic asupra viabilității protoplastelor și poate induce fuziunea acestora (*Mathe* și *Rakosy-Tican*, 1991; *Rakosy-Tican*, 1996; *Rakosy-Tican* și colab., brevet OSIM 1989; *Rakosy-Tican* și colab., 1998).

Swanson și colaboratorii (1985), au descris, pentru calusul embriogen de porumb, o metodă de purificare foarte eficientă, folosind o coloană de "Sepharose 6MB", activată cu bromură cianică și cellulase RS. Contaminarea protoplastelor cu subprotoplaste și cu resturi celulare a fost, astfel, redusă aproape la zero, după o singură trecere prin coloană. Pentru a obține populații pure de protoplaste s-au aplicat chiar și tehnici de electroforeză (*Halim* și *Pearce*, 1980).

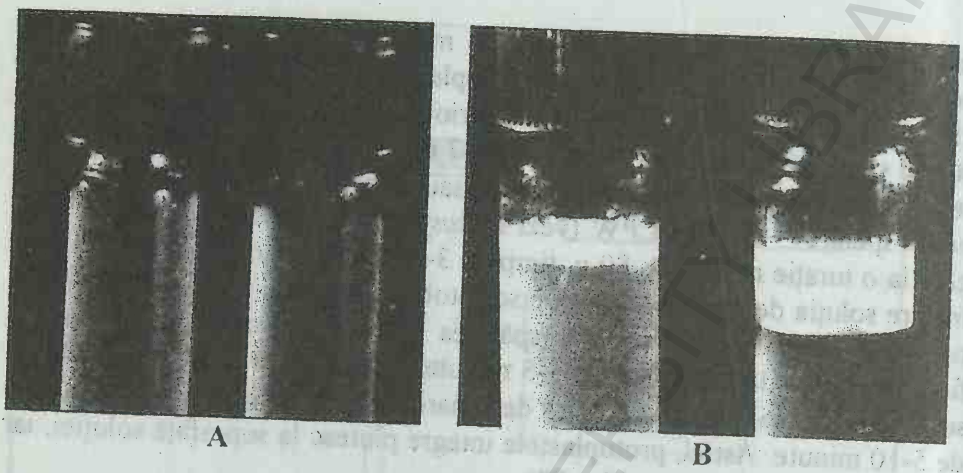


Fig. 79. Imagini reprezentând comparativ eficiența separării protoplastelor în soluție izoosmolară de zaharoză (partea stângă) sau de sulfat de magneziu (partea dreaptă): A - protoplaste mezofiliene de *Petunia parodii*; B – protoplaste izolate din suspensii celulare de *Petunia hybrida*, forma mutantă albinotică "albino Comanche"

Stabilirea numărului și a viabilității protoplastelor, după purificare, indiferent de metoda aplicată și de scopul experimentului - cultura, fuziunea, transformarea genetică sau utilizarea în cercetări fundamentale de biologie celulară – se stabilește numărul de protoplaste la 1 ml de mediu, respectiv viabilitatea protoplastelor. Stabilirea densității protoplastelor se realizează cu ajutorul hemocitometrului și se raportează la 1 g de țesut proaspăt (*Rakosy-Tican*, 1998). Pentru evidențierea viabilității la nivel celular, se pot utiliza două categorii de coloranți vitali:

- coloranți vitali absobiți de celulele viabile
- coloranți vitali absorbiți de celulele moarte și de resturile celulare.

Din prima categorie, este utilizat, pentru protoplastele vegetale, mai ales diacetatul de fluoresceină - DAF (*Widholm*, 1972; *Larkin*, 1976; *Rakosy-Tican*, 1998). Acest compus este nefluorescent, dar el pătrunde cu ușurința prin membrana plasmatică a protoplastelor. In citosol și în organite, sub acțiunea esterazelor DAF este descompus în fluoresceină, un compus fluorescent care nu poate trece prin membrana intactă. De aceea, protoplastele viabile analizate la microscopul cu lumină UV, albastră (folosind, de exemplu, microscoapele IOR MC-1, MC-5 sau microscopul cu epifluorescentă Olympus BX-60), vor prezenta o fluorescență verde vie, în contrast cu protoplastele non-viabile nefluorescente (fig. 80). Protoplastele mezofiliene evidențiază în UV fluorescența nativă, roșie, a clorofilei, care se păstrează atât la nivelul cloroplastelor eliberate din celulă cât și în soluția de clorofilă. In acest caz,

protoplastele moarte vor prezenta fluorescența roșie specifică clorofilei, iar cele vii, fluorescența verde specifică DAF.

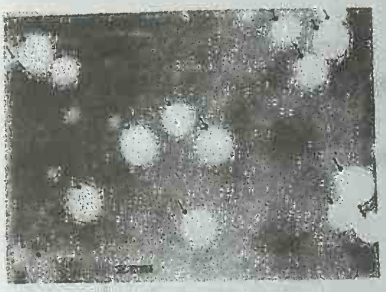


Fig. 80. Imagine microscopică reprezentând protoplaste viabile colorate cu diacetat de fluoresceină (DAF) (indicate prin săgeată), prezentând în lumină UV, albastră, o fluorescență verde vie (bara = 50 μm)

Din cea de a doua categorie de coloranți vitali fac parte fenosafranina (*Evans* și *Bravo*, 1983) sau albastrul Evans (*Kania* și *Edwards*, 1973), compuși pentru care membrana celulară intactă nu este permeabilă. Aceștia se evidențiază, de asemenea, prin analiza protoplastelor colorate în lumină UV.

6.3. IZOLAREA SUBPROTOPLASTELOR VEGETALE

Subprotoplastele, reprezentând fragmente celulare înconjurate de plasmalemă, pot fi izolate fie prin șoc osmotic, urmat de o izolarea mecanică a acestora (fig. 81), fie prin supunerea suspensiei de protoplaste la o centrifugare diferențiată, la turație mare, în gradient de zaharoză și manitol (*Lorz* și colab., 1976; *Wallin* și *Glimelius*, 1977; *Lesney* și colab., 1983,1986), sau de manitol și Percoll (*Lorz* și colab., 1981).

Fig. 81. Imagine de microscopie optică ilustrând formarea de ***subprotoplaste*** din celule alungite, prozenchimatice, evidențiate în epiderma bulbului de ceapă, sub acțiune unei soluții de zaharoză 0,8 M (x 200)

Prin metodele descrise se pot izola următoarele tipuri de ***subprotoplaste*** (fig.82):

- ***citoplaste*** – subprotoplaste bogate în citoplasmă și în organite mici, dar lipsite de nucleu;

- ***miniprotoplaste***, ***karioplaste*** sau ***nucleoplaste*** – subprotoplaste prezentând nucleul înconjurat de un strat subțire de citoplasmă și membrana plasmatică;
- ***microplaste***, care conțin un strat de citoplasmă și preponderent un tip de organite, de exemplu: *condrioplaste* care conțin mitocondrii, *plastoplaste* bogate în plastide etc.;
- ***vacuoplaste*** – prezentând vacuola înconjurată de un strat subțire de citoplasmă și de plasmalemă.

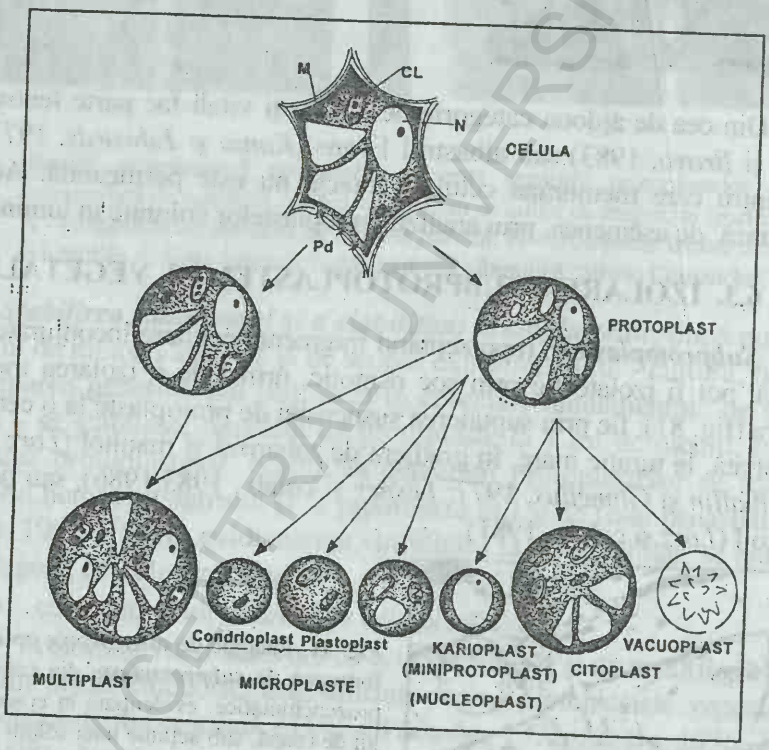


Fig. 82. Reprezentarea schematică a principalelor tipuri de subprotoplaste (după *Bornman* și *Bornman*, 1985 – modificat): N = nucleu; CL = cloroplast; M = mitocondrie; Pd = plasmodesme. (La nivelul vacuoplastului se observă o maclă de oxalat de calciu)

Izolarea subprotoplastelor prezintă un deosebit interes pentru cercetările de **inginerie endocitobiotică** (*Rakosy-Tican*, 1998)– care urmăresc transferul separat al organitelor celulare, cu informația genetică aferentă și obținerea așa numiților ***cibrizi***. Subprotoplastele pot servi, de asemenea, pentru transferul parțial de material genetic.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

Subprotoplastele nu prezintă totipotenţialitate, dar prin fuziunea lor se poate reconstitui o celulă, eventual hibridă.

6.4. CULTURA DE PROTOPLASTE VEGETALE

Metodele folosite pentru cultura protoplastelor vegetale izolate sunt, în mare măsură, asemănătoare celor utilizate pentru cultura ţesuturilor şi a celulelor. Cultura protoplastelor necesită, însă, mai multă atenţie şi dexteritate, din cauza fragilităţii deosebite a acestora şi a numeroaselor etape de transfer pe mediul proaspăt, caracteristice pentru majoritatea protocoalelor de cultură. Acest transfer are ca scop ajustarea osmolarităţii şi a compoziţiei mediului, de aşa manieră, încât să fie stimulată resintetizarea peretelui celular şi diviziunea celulară, respectiv, organogeneza sau embriogeneza. Mai mult, protoplastele izolate necesită medii cu un conţinut mai bogat în compuşi organici, cum ar fi vitamine, aminoacizi, glicoalcooli sau fitohormoni.

Principalele etape experimentale ale izolării, purificării şi culturii protoplastelor vegetale sunt redate în fig. 83.

Stabilirea metodei de cultură a protoplastelor speciilor parentale este, totodată, o etapă care precede experimentele de hibridare somatică. Cunoaşterea cerinţelor nutriţionale ale protoplastelor speciilor implicate în hibridarea somatică permite, pe de o parte, stabilirea condiţiilor de regenerare a celulelor hibride iar, pe de altă parte, poate reprezenta o cale de selecţie a acestora. ***Mediile de cultură*** folosite pentru protoplastele izolate conţin, în principiu, aceleaşi componente cu cele utilizate pentru cultura celulelor şi ţesuturilor. In plus, la medii se adaugă stabilizatorul osmotic şi unele componente organice. O serie de medii de cultură au la bază componentele mediului *Murashige-Skoog* (MS)(1962), amintim astfel: mediul *Nagata* şi *Takebe* (1971); mediul T0 (*Bourgin* şi colab., 1979); mediul F5 (*Frearson* şi colab., 1973); mediul DPD (*Durand* şi colab.,1973) şi mediul V-47 (*Binding*, 1974 b). Alte medii, adeseori folosite pentru cultura protoplastelor vegetale, sunt: mediul B5 (*Gamborg* şi colab., 1968); mediul KM (*Kao* şi *Michayluk*, 1975); mediul V-KM (*Binding* şi *Nehls*, 1977), care combină sărurile mediului V-47 cu componentele organice modificate ale mediului KM etc.

Dintre componentele minerale ale mediilor standard, o importanţă deosebită, pentru cultura protoplastelor vegetale, o au **cantităţile de amoniu** şi **calciu**. In timp ce, pentru ionul amoniu s-au raportat atât efecte benefice (*Arnold* şi *Eriksson*, 1977; *Bhojwani* şi colab., 1977; *Nehls*, 1978; *Crepy* şi colab., 1982), cât şi efecte adverse (*Kao* şi colab., 1973; *Meyer*, 1974; *Shepard* şi *Totten*, 1977; *Boyes* şi colab., 1980; *Zapata* şi colab., 1981), pentru ionul de

calciu efectul stimulator asupra ratei de supravieţuire şi a capacităţii de regenerare a protoplastelor este bine documentat (*Kao* şi colab., 1973; *Arnold* şi *Eriksson*, 1977; *Bhojwani* şi colab., 1977; *Caboche*, 1980; *Xuan* şi *Menczel*, 1980; *Jia*, 1982).

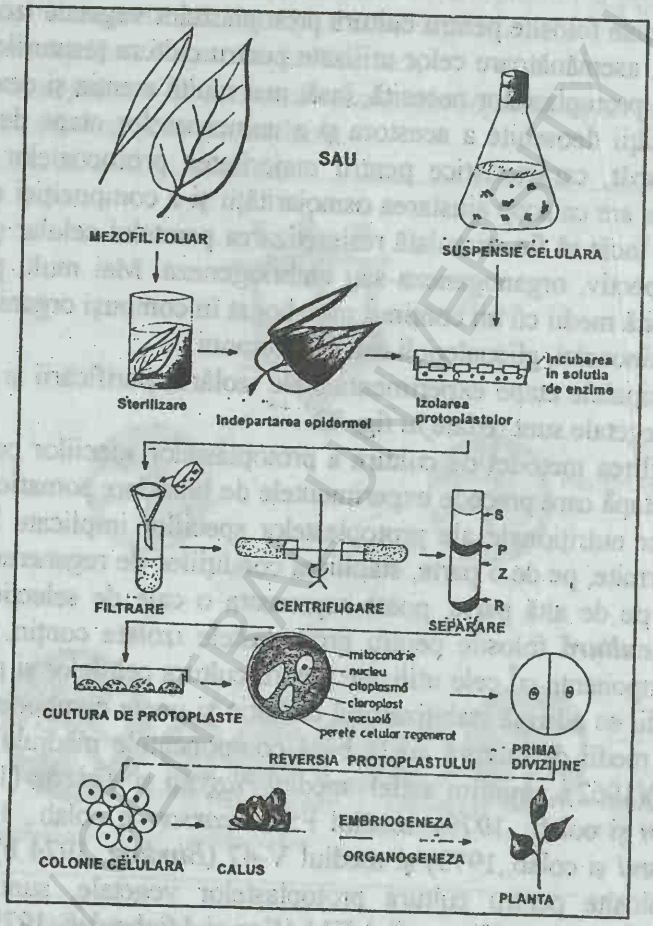


Fig. 83. Reprezentarea principalelor etape de izolare şi cultură a protoplastelor vegetale (S = soluţie izoosmolară de sorbitol; P = protoplaste separate; Z = soluţie izoosmolară de zaharoză; R = reziduu - resturi celulare)

In privinţa rolului şi concentraţiei optime a unor microelemente specifice, există foarte puţine studii, în general, considerându-se ca fiind adecvată compoziţia mediilor standard. Ionul de Fe este cel mai bine metabolizat de către protoplaste, atunci când el este adaugat la mediul de cultură sub formă de

Fe-EDTA (*Arnold* şi *Eriksson*, 1977), dar, pentru unele specii, alte forme de Fe chelatat pot fi mai potrivite. Aceeaşi autori au subliniat necesitatea suplimentării mediilor cu **iod**, sub formă de KI. *Caboche* (1980), crescând concentraţia microelementelor în mediul T0, de trei ori, a obţinut o stimulare semnificativă a eficienţei formării de colonii celulare din protoplastele de tutun.

Ca **sursă de carbon**, se adaugă la mediile de cultură a protoplastelor, cel mai adesea, zaharoză în concentraţii de 1 - 4 %. *Uchimiya* şi *Murashige* (1976) au demonstrat că zaharoza este cea mai potrivită sursă de carbon, pentru regenerarea peretelui celular şi pentru diviziunea protoplastelor de tutun. Zaharoza nu poate fi folosită ca sursă de carbon şi ca stabilizator osmotic, în acelaşi timp, ea adăugându-se la stabilizatorul osmotic, manitol sau sorbitol, în concentraţie mult mai mică decât acesta (*Wallin* şi *Eriksson*, 1973). Dimpotrivă, glucoza poate servi atât ca sursă de carbon, cât şi ca stabilizator osmotic, dând rezultate foarte bune în culturile de protoplaste. De aceea, utilizarea glucozei în mediile de cultură a devenit o practică obişnuită în multe laboratoare (*Maheshwari* şi colab., 1986). Alţi compuşi de natură glucidică, cum ar fi riboza sau xiloza, care intervin în biosinteza peretelui celular, sunt uneori, incluşi în componenţa mediilor de cultură (*Kao* şi *Michayluk*,1975; *Vasil* şi *Vasil*, 1979). Pentru cultura protoplastelor, la o densitate mică, se utilizează medii bogate în glucide; un astfel de mediu este mediul KM, care conţine: fructoză, riboză, xiloză, manoză, ramnoză şi celobioză. Alături de glucide, unii acizi organici, îndeosebi cei ce intervin în ciclul *Krebs*, pot exercita un rol benefic asupra eficienţei regenerării protoplastelor (*Kao* şi *Michayluk*, 1975; *Caboche*, 1980; *Negruţiu* şi *Mousseau*, 1980; *Muller* şi colab., 1983 etc.).

Prezenţa unor **vitamine** în mediul de cultură a protoplastelor are efecte benefice la majoritatea speciilor. Astfel, acidul nicotinic, piridoxina (vitamina B6) şi tiamina (vitamina B1), asemănător altor tipuri de explante, sunt absolut necesare pentru cultura protoplastelor; acidul folic şi mezo-inozitolul stimulează rata de diviziune a acestora, pe când biotina, pantotenatul de calciu şi riboflavina nu au nici un efect, la unele specii. Biotina a fost esenţială pentru cultura protoplastelor de ovăz (*Brenneman* şi *Galston*, 1975), iar mezo-inozitolul s-a dovedit a fi absolut necesar atât pentru protoplastele de tutun (*Caboche*, 1980), cât şi pentru cele de fasole (*Xu* şi colab., 1981).

Adăugarea **fitohormonilor**, auxine şi citochinine, la mediile de cultură a protoplastelor, este esenţială pentru iniţierea diviziunii celulare şi dezvoltarea în continuare a acestora, după cum s-a demonstrat pentru sistemul model, protoplastele de tutun (*Nagata* şi *Takebe*, 1970; *Uchimiya* şi *Murashige*, 1976). Concentraţiile optime, atât pentru auxine, cât şi pentru citochinine, variază în

funcție de densitatea inoculului, sursa de protoplaste și factorii genetici. Alți hormoni pot exercita, de asemenea, un efect stimulator asupra regenerării protoplastelor. Astfel, s-a demonstrat că acidul abscizic stimulează formarea de lăstari, din calusul derivat din protoplaste de cartof (*Shepard*, 1980), iar Picloramul este foarte eficient pentru culturile pornind de la un inocul cu densitate mică (*Muller* și colab., 1983).

Alți **compuși de natură organică** pot stimula regenerarea protoplastelor: poliaminele (*Galston* și colab., 1980; *Kaur-Sawhney* și colab., 1980; *Huhtien* și colab., 1982); aminoacizii, în particular, glutamina (*Furner* și colab., 1978; *Kirby* și *Cheng*, 1979; *Crepy* și colab., 1982; *Gamborg* și colab., 1983a), precum și unele ***extracte***: hidrolizat de cazeină, extract de drojdie, lapte de nucă de cocos, extract de cartof etc.

Condițiile fizice necesare culturilor de protoplaste izolate sunt, în general, asemănătoare celor utilizate pentru culturile de țesuturi vegetale. Temperatura optimă se stabilește pentru fiecare specie în parte, cel mai adesea, folosindu-se temperaturi de 25^0C - 30^0C. In primele zile de cultură, majoritatea protoplastelor necesită o perioadă de întuneric, urmată de trecerea treptată a culturilor la lumină. Unele protoplaste cresc în primele zile la fel de bine la lumină, ca și la întuneric. *Lozovaya* și colaboratorii (1984), au demonstrat că lumina stimulează transportul glucozei prin plasmalemă și, pe această cale, activează resintetizarea peretelui celular. In condiții de mediu mixotrof, la lumină și pe mediu cu glucoză, protoplastele mezofiliene își regenerează mai repede peretele celular, prezentând, totodată, o ultrastructură normală (*Tarchevsky* și colab., 1984).

Cultura protoplastelor individuale necesită metode speciale, prin reducerea volumului mediului de cultură și îmbogățirea lui cu compuși de natură organică.

Metode de cultură a protoplastelor: în general, se disting următoarele modalități de cultură a protoplastelor:

- cultura în mediul lichid
- cultura în / sau pe mediul solid
- cultura "doică"

- ***Cultura în mediul lichid***: reprezintă cea mai simplă și, totodată, cea mai larg utilizată metodă de cultură a protoplastelor vegetale. In acest caz, după purificare, protoplastele se trec în mediul de cultură, iar densitatea protoplastelor, în mediul de cultură, se ajustează la valori de 10^4 - 2×10^4 protoplaste/ml. Câțiva mililitrii, de obicei 2 ml sau 4 ml suspensie de protoplaste se trec fie în cutii Petri de plastic, având un diametru de 5 cm,

fie în cutii Petri de sticlă, cu un diametru de 7 cm. Se obține, astfel, un strat lichid având o înălțime de aproximativ 1 - 5 mm, ceea ce permite o aerare corespunzătoare a culturii. In ultimii ani, au apărut pe piață o serie de cutii din plastic, sterile, cu camere multiple care sunt potrivite în special, pentru testarea unui mare număr de medii de cultură. După ce majoritatea protoplastelor au intrat în prima diviziune celulară, se adaugă mediu de cultură proaspăt, având o osmolaritate tot mai scăzută. Coloniile celulare regenerate din protoplaste, se mențin în mediul lichid până când ajung la un diametru de 1 - 2 mm, după care sunt trecute pe mediul solid.

Pentru speciile recalcitrante, s-au stabilit metode de cultură în mediul lichid, la o densitate mai mare de 10^5 protoplaste/ml, considerându-se că în acest fel se realizează o auto-condiționare a mediului, care este favorabilă regenerării protoplastelor.

O altă variantă de cultură a protoplastelor este cea a unui strat de mediul lichid, deasupra unui strat de mediu solidificat. Această metodă se pretează, îndeosebi, pentru culturile "doică".

O metodă interesantă, considerată ca o variantă a culturii în mediul lichid, este cea a micropicăturilor. Această metodă constă în pipetarea suspensiei de protoplaste sub formă de micropicături, având un volum de 40 -100 µl, în vasele de cultură, micropicăturile fiind dispuse sub formă erectă sau suspendată. *Potrykus* și colaboratorii (1979), au imaginat o metodă de cultură a micropicăturilor extrem de eficientă, atunci când populația de protoplaste a fost mai puțin densă și s-a urmărit testarea eficienței unei palete largi de medii de cultură. Cultura în micropicături este utilă, în particular, pentru cultura heterocarionilor selectați manual. Această tehnică oferă posibilitatea observației microscopice și a testării unei game largi de medii de cultură. Urmând tendința reducerii volumului de mediu de cultură lichid, în așa fel încât să fie cultivate protoplaste individuale, *Koop* și colaboratorii (1983) și *Koop* și *Schweiger* (1985), au dezvoltat o metodă deosebită, aceea a culturii unui singur protoplast sau heterocarion, într-un volum de mediu de 10 nl, sub un strat de ulei mineral. In acest caz extrem, reducerea volumului mediului de cultură, care asigură probabil concentrarea exudatelor celulare, trebuie însoțită de îmbogățirea mediului de cultură cu componente de natură organică.

- ***Cultura de protoplaste vegetale în mediul semi-solid***: solidificarea mediului cu ***agar*** a fost prima variantă folosită pentru a cultiva protoplaste de tutun (*Nagata* și *Takebe*, 1971). Avantajul acestei metode constă în aceea că, dezvoltarea coloniilor din protoplaste individuale poate fi urmărită cu mai multă ușurință și acuratețe, iar determinarea eficienței de regenerare a coloniilor celulare ("plating efficiency") se poate realiza mai exact, compa-

rativ cu culturile realizate în mediul lichid. Formarea de agregate celulare în mediul lichid şi tendinţa protoplastelor de a sedimenta în timp, complică estimarea eficienţei unei culturi date. Deoarece agarul s-a dovedit toxic, pentru unele protoplaste vegetale, s-a testat şi efectul altor agenţi de gelificare, cum ar fi: agaroza, alginatul, gelatina, epoxipolizaharidele sau poliacrilamida (*Davey*, 1983; *Rakosy-Tican*, 1991). Dintre acestea, ***agaroza*** şi ***alginatul***, două geluri având mecanisme diferite de gelificare, au dat rezultate deosebite, chiar şi pentru unele specii recalcitrante, cum ar fi floa-

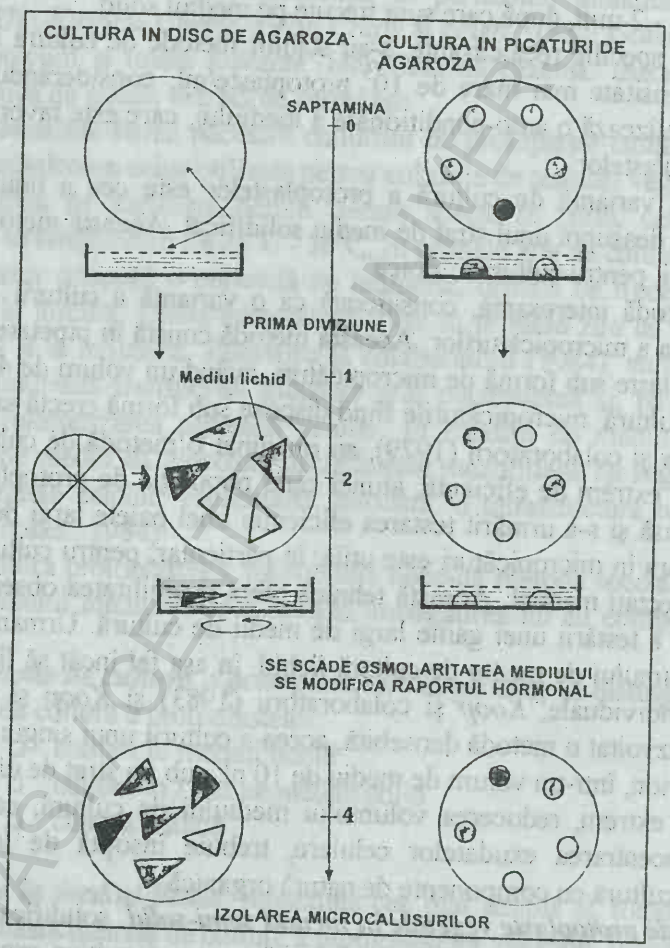


Fig. 84. Schemă reprezentând două modalităţi diferite de cultură a protoplastelor imobilizate în gel de agaroză, cultura în disc de agaroză ("agarose bead culture"), respectiv cultura în picături de agaroză ("agarose disc culture") (după *Shillito* şi colab., 1983)

rea soarelui. Utilizarea agarozei, în așa numita "bead culture", constând în flotarea fragmentelor de agaroză cu protoplastele imobilizate, în mediu de cultură lichid, cu agitare continuă, a mărit eficiența regenerării coloniilor celulare, la o serie de specii de plante (*Shillito* și colab., 1983; fig. 84). Rezultate bune s-au obținut, de asemenea, prin imobilizarea protoplastelor în mediul solidificat cu agaroză și dispus sub formă de picături solide pe fundul unei cutii Petri, acoperite cu mediul lichid (fig. 84) – așa numita "disc culture".

Agaroza gelifică prin răcirea mediului, de aceea, pentru astfel de experimente și pentru a nu afecta viabilitatea protoplastelor, se utilizează agaroză cu temperatură joasă de gelificare. Cultura protoplastelor imobilizate în gel de agaroză are avantajul schimbării mediului lichid rapid și cu multă ușurință, iar concentrarea protoplastelor în discurile de agaroză, grăbește regenerarea acestora (*Binding*, 1974; *Binding* și *Kollmann*, 1985).

Alginatul de sodiu, spre deosebire de agar sau agaroză, gelifică în prezența ionilor de calciu și formează un gel care nu afectează protoplastele, nefiind toxic pentru acestea (fig. 85). Mai mult, prin structura sa gelul de alginat imită peretele celular natural, stimulând regenerarea protoplastelor, pentru multe specii de plante (v. *Rakosy-Tican*, 1991).

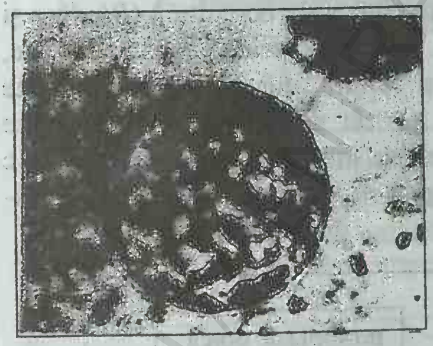


Fig. 85. Protoplast mezofilian de grâu imobilizat în gel de alginat, observat la microscopul optic – este vizibilă imitarea prezenței unui perete celular (bara = 10 μm)

Astfel, imobilizarea în gel de alginat a fost benefică pentru regenerarea proto-plastelor la *Glycine max* (*Tricoli* și colab., 1986), *Brassica napus* (*Draget* și colab., 1988), *Abies alba* (*Lang* și *Kohlenbach*, 1989), *Arabidopsis thaliana* (*Karesch* și colab., 1991), *Beta vulgaris* (*Schlangstedt* și colab., 1992), sau *Helianthus annuus* (*Fischer* și colab., 1992; *Rakosy-Tican* și colab., 1998 – vezi exemplul prezentat mai jos). Gelificarea alginatului se poate realiza sub formă de:

- sfere de alginat
- disc de alginat.

Sferele de alginat se realizează prin picurarea unei soluţii alcătuită din alginat de sodiu şi protoplaste, într-o soluţie izoosmolară bogată în $CaCl_2$. Sferele de gel, obţinute astfel, se spală cu o soluţie salină şi sunt transferate într-un mediu de cultură lichid.

Gelificarea alginatului sub formă de disc se realizează prin transferul soluţiei de alginat de sodiu, în care s-au incorporat protoplaste, pe suprafaţă unui mediu solid bogat în $CaCl_2$. Discul obţinut în acest mod, se poate transfera direct într-un mediu lichid. Asemănător agarozei, imobilizarea protoplastelor în gel de alginat facilitează schimbarea mediului şi concentrează protoplastele, stimulând regenerarea lor. Imobilizarea protoplastelor în epoxipolizaharide este foarte asemănătoare cu imobilizarea în alginat, gelificarea realizându-se în prezenţa ionilor de calciu sau de magneziu. Pentru acest tip de agent de gelificare, s-a realizat gelificarea sub formă de sfere (*Haicour* şi *Sihachakr*, 1995).

- **Cultura protoplastelor în sistem "doică"**: după cum s-a mai arătat, densitatea optimă a protoplastelor în cultură este de 10^4 - 2 x 10^4 protoplaste/ml, iar valoarea minimă pentru reuşita regenerării este considerată o densitate de 10^3 protoplaste/ml. Dacă nu se poate asigura această densitate minimă, în special în cazul heterocarionilor, trebuie utilizate metode speciale de cultură cum ar fi cultura "doică" - "feeder-layer" sau "nurse culture"(*Raveh* şi *Galun*, 1975), sau tehnica de co-cultură (*Binding* şi *Nehls*, 1978; *Menczel* şi colab., 1978). Datele experimentale, acumulate, au demonstrat că, se pot utiliza - ca şi culturi „doică"- atât protoplaste inactivate prin iradiere (raze X sau γ), cât şi protoplaste sau celule active. In cazul co-culturii, protoplastele de interes nu sunt separate fizic de protoplastele care au rolul de a asigura exudate celulare cu rol stimulator (fig. 86).

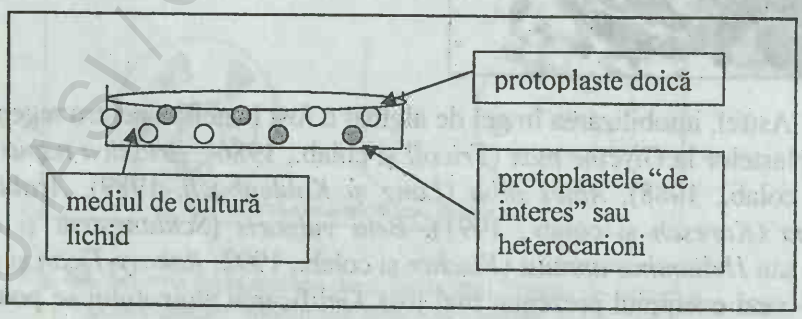


Fig. 86. Reprezentarea schematică a sistemului de co-cultură

In acest caz, se utilizează fie protoplaste inactivate prin iradiere, care nefiind capabile de regenerare vor asigura doar stimularea protoplastelor "de interes" – a căror regenerare se doreşte a fi stimulată, fie protoplaste izolate de la mutante albinotice. Forme mutante albinotice, având afectată calea de bisinteză a clorofilelor,sunt cunoscute mai ales la specia model, tutunul. Selecţia lăstarilor regeneraţi se realizează, în această situaţie, prin separarea lăstarilor verzi, capabili să sintetizeze clorofila, de cei albinotici. Pe de altă parte, s-au imaginat numeroase metode de cultură "doică", astfel:

- cultura protoplastelor "de interes" într-o picătură de mediu lichid, separat printr-o membrană filtrantă sau printr-o hârtie de filtru, de un mediu solid în care sunt imobilizate protoplaste sau celule "doică"(fig. 87);

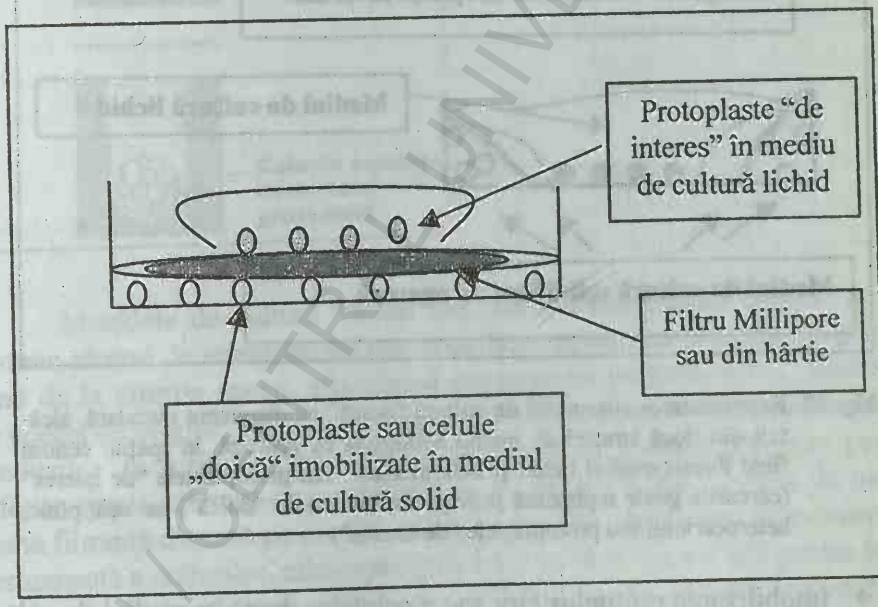


Fig. 87. Reprezentarea schematică a sistemului de cultură „doică" în care protoplastele doică sunt cultivate în mediul solid, iar cele „de interes" în mediul lichid, cele două tipuri de protoplaste fiind separate printr-un filtru Millipore sau din hârtie de filtru

- imobilizarea protoplastelor "de interes" în gel de agaroză sau alginat, sub formă de sfere sau disc, şi suspendarea acestora în mediul lichid în care se află protoplaste sau celule doică, eventual inactivate;

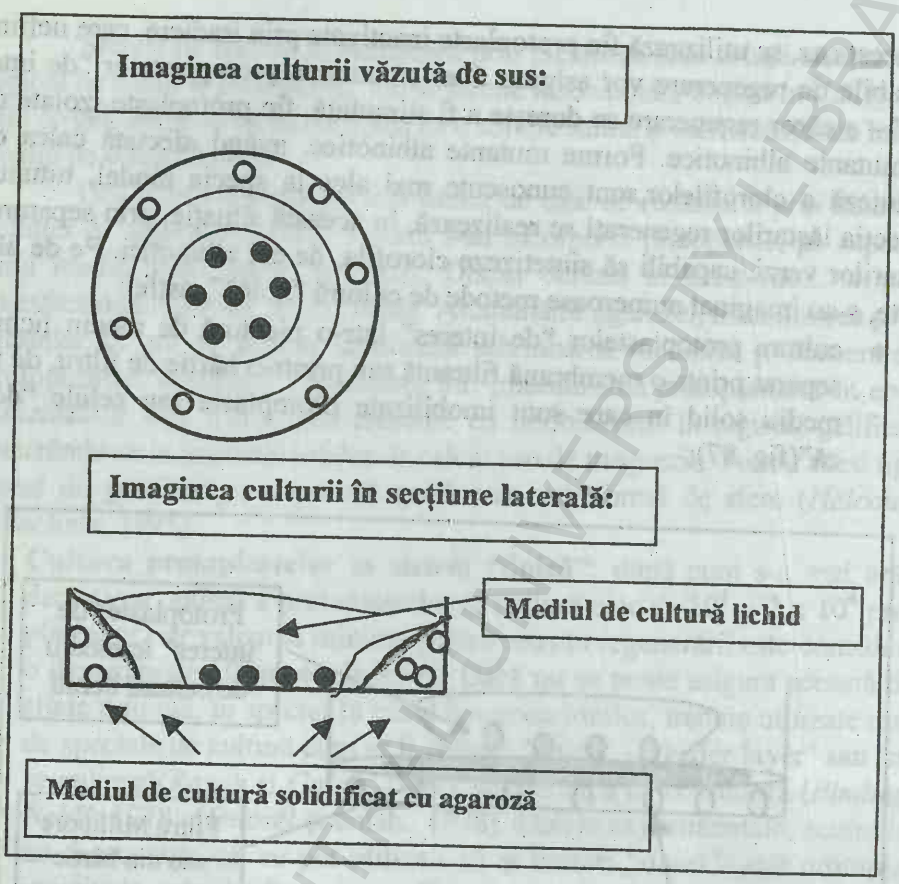


Fig. 88. Reprezentarea sistemului de cultură "doică" cu dispunere circulară, alcătuit din două straturi de mediu solidificat cu agaroză, în spațiul central fiind dispus mediul lichid și heterocarionii sau protoplastele "de interes" (cercurile goale reprezintă protoplaste sau celule "doică", iar cele pline, heterocarionii sau protoplastele "de interes")

- imobilizarea protoplastelor sau a celulelor doică în mediul de cultură solidificat cu agaroză, pipetat într-un strat circular, la periferia cutiei Petri, urmat de un strat de mediu solidificat cu agaroză, dar lipsit de celule sau protoplaste și amplasarea protoplastelor "de interes" în zona centrală, într-un mediu lichid (fig. 88);
- o metodă specială a fost imaginată pentru protoplastele individuale, constând în dispunerea acestora în mediul lichid, în adâncituri ale mediului solid, iar la suprafață se amplasează protoplaste doică, separate printr-o membrană filtrantă (*Eigel* și *Koop*, 1989, fig. 89).

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

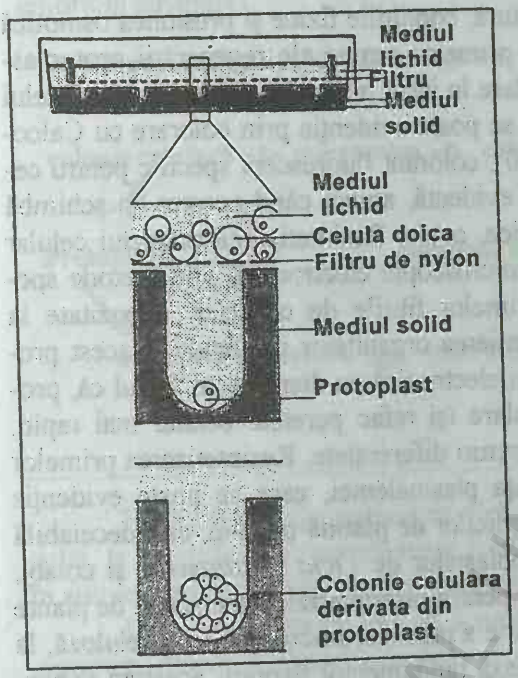


Fig. 89. Reprezentarea sistemului de cultură "doică", pentru stimularea regenerării protoplastelor sau a hetero-carionilor individuali (după *Eigel* şi *Koop*, 1989)

Metodele de cultură "doică" au câteva caracteristici interesante, şi anume: efectul de stimulare nu este specific – celule sau protoplaste, provenind de la diferite specii, stimulează regenerarea protoplastelor, indiferent de specia de origine, facilitând regenerarea protoplastelor recalcitrante sau a produşilor de fuziune. Deşi diferite metode s-au dovedit potrivite pentru diferite specii, sitemul de cultură doică, în mediul lichid, separat de membrană filtrantă dispusă pe mediul solid, nu permite observarea microscopică, permanentă a culturilor, eficienţa regenerării putând fi apreciată numai la nivelul coloniilor celulare vizibile cu ochiul liber. In schimb, sistemul de cultură doică sub formă de straturi circulare, permite o permanentă observare microscopică a culturilor, dovedindu-se util chiar şi în regenerarea produşilor de fuziune, rezultaţi din electrofuziunea perechilor preselectate de protoplaste (*Rakosy-Tican*, 1998; *Rakosy-Tican* şi colab., 2001).

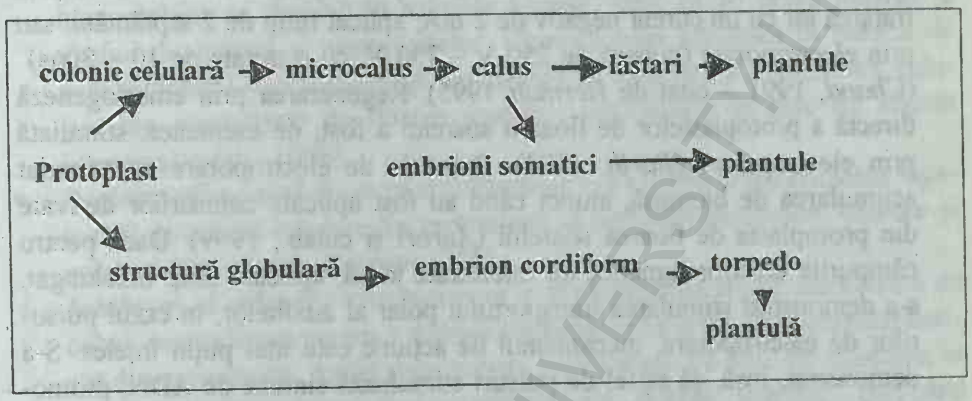
Indepărtarea unor compuşi toxici din mediile de cultură se realizează fie prin adăugarea de cărbune activ, prin utilizarea suporturilor din hârtie de filtru, fie, mai recent, prin utilizarea unor membrane filtrante.

6.5. REGENERAREA PLANTELOR DIN PROTOPLASTE

Compoziția mediului de cultură, condițiile fizice și presiunea osmotică corespunzătoare determină apariția primelor semne ale regenerării protoplastelor, prin gruparea organitelor celulare în jurul nucleului și refacerea peretelui celular. Peretele celular nou format se poate evidenția prin colorare cu Calcofluor White (*Nagata* și *Takebe*, 1970), colorant fluorescent specific pentru celuloză. Reversia protoplastelor este evidentă, atunci când acestea își schimbă forma în cultură, devenind din sferice, ovale. Resintetizarea peretelui celular poate fi analizată și prin studii de microscopie electronică, prin metode speciale fiind posibilă evidențierea primelor fibrile de celuloză, depozitate la suprafața plasmalemei, dar și evidențierea organitelor implicate în acest proces. Studiile de microscopie optică și electronică au demonstrat faptul că, protoplastele izolate din suspensii celulare își refac peretele celular mai rapid, comparativ cu cele provenind din țesuturi diferențiate. Resintetizarea primelor microfibrile de celuloză, la suprafața plasmalemei, care se poate evidenția electronomicroscopic prin tehnica replicilor de platină-paladiu, este decelabilă după 10 - 20 minute, în cazul protoplastelor de *Vicia* (*Williamson* și colab., 1977), sau după 8 - 24 h de la izolare pentru protoplastele altor specii de plante (*Vasil* și *Vasil*, 1980). Apariția timpurie a primelor microfibrile de celuloză, la suprafața protoplastelor, nu influențează randamentul fuziunii acestora (*Thorpe*, 1978). O dată cu regenerarea peretelui celular, protoplastele își pierd forma sferică caracteristică și intră în diviziune, în general, după cca. 2 - 7 zile de cultură. Prima diviziune are loc mai mult sau mai puțin sincron, în funcție de gradul de heterogenitate al suspensiei de protoplaste, aflate în cultură. După alte 2 - 3 săptămâni, protoplastele formează colonii celulare. Atunci când coloniile celulare devin vizibile, atingând dimensiuni de 1 - 2 mm, ele se transferă pe mediul solid, pentru inducerea calusogenezei și, ulterior a organogenezei. Protoplastele pot, însă, evolua și direct spre formarea de embrioni somatici, foarte asemănători embrionilor zigotici. In acest caz, din protoplaste se formează o structură globulară, compactă, care evoluează spre stadiul cordiform, apoi spre stadiul de torpilă, respectiv embrionul format germinează și dă naștere la o plantulă. In dezvoltarea acestui embrion somatic, un rol deosebit de important îl joacă diferențierea meristemelor: caulinar și radicular. Conversia embrionilor somatici în plantule, se aseamănă cu aceea a embrionilor formați din țesuturi sau celule cultivate *in vitro*. Foarte frecvent, la nivelul embrionilor somatici ***primari***, se formează embrioni ***adventivi***. Embriogeneza ***secundară*** are loc la nivelul țesuturilor superficiale ale embrionului primar. Se formează,

astfel, aglomerări de embrioni secundari care pot genera, în continuare, alți embrioni adventivi.

Schema 1. Principalele căi de regenerare a plantelor din protoplaste izolate



Evoluția pe cale embriogenetică poate avea loc și după formarea calusului, la nivelul căruia pot să apară formațiuni embrionare. Modul de evoluție în cultură variază în funcție de genotip și de protocolul experimental utilizat.

Deși, metodele de cultură a protoplastelor sunt, încă, în mare măsură empirice, numărul plantelor pentru care s-a stabilit deja un protocol experimental de regenerare a crescut foarte mult, depășind, la începutul anilor nouăzeci, cifra de 280 de specii (*Puite*, 1992), la care s-au adăugat noi reușite, în ultimii zece ani. De remarcat faptul că, în ultimii ani s-a reușit regenerarea plantelor din protoplaste izolate, pentru majoritatea cerealelor, folosind ca sursă de izolare suspensiile celulare embriogene, precum și pentru unele plante forestiere și ornamentale, ceea ce a deschis noi căi de modificare genetică a acestor importante grupe de plante.

6.6. METODE DE STIMULARE A CAPACITĂȚII MORFOGENETICE A PROTOPLASTELOR

Pentru stimularea capacității regenerative a protoplastelor s-au aplicat diferite metode. Prezentăm, în continuare, câteva dintre acestea.

- ***Electrostimularea*** – în anii optzeci, *Goldsworthy* și *Rathore* au emis ipoteza conform căreia țesuturile vegetale cultivate *in vitro* își pierd polaritatea naturală, în absența controlului electric al organismului vegetal. Aplicarea unor câmpuri electrice externe, poate induce, conform acestei ipoteze, stimularea morfogenezei (vezi *Herman*, 1995). Ipoteza a fost confirmată, prin stimularea regenerării plantelor din diferite tipuri de explante, fie prin aplicarea unor câmpuri electrice de intensitate joasă, pentru o peri-

oadă mai lungă de timp (câteva săptămâni), în prezența auxinelor, fie prin aplicarea unor pulsuri de electroporare (pulsuri de intensitate mare și durată foarte scurtă de acțiune, de ordinul micro sau milisecundelor). Astfel, a fost stimulată regenerarea din protoplaste de *Solanum viarum*, prin tratarea lor cu un curent negativ de 2 mA, aplicat timp de 2 săptămâni, sau prin electroporare (pulsuri de 250 V – 750 V, cu o durată de 10 – 30μs) (*Chand*, 1991 – citat de *Herman* 1995). Regenerarea prin embriogeneză directă a protoplastelor de floarea soarelui a fost, de asemenea, stimulată prin electroporare (*Barth*, 1993). Pulsurile de electroporare au stimulat acumularea de biomasă, atunci când au fost aplicate calusurilor derivate din protoplaste de floarea soarelui (*Aurori* și colab., 1999). Dacă pentru câmpurile electromagnetice de intensitate joasă, aplicate timp îndelungat, s-a demonstrat stimularea transportului polar al auxinelor, în cazul pulsurilor de electroporare, mecanismul de acțiune este mai puțin înțeles. S-a demonstrat, însă, că astfel de pulsuri stimulează sinteza de ADN, promovând atât regenerarea coloniilor celulare din protoplaste, cât și regenerarea de plantule, din calusuri derivate din acestea. Mai mult, efectul de electrostimulare se păstrează timp de mai multe generații celulare (*Davey* și colab., 1996; *Rakosy-Tican* și colab., 2000).

- ***Câmpurile magnetice*** – a fost studiat efectul câmpului magnetic cvasi-nul, care a stimulat eficiența regenerării coloniilor celulare derivate din protoplaste, la floarea soarelui, conform modelului de fereastră sezonieră (*Aurori* și colab., 1998).
- ***Oxigenarea*** – îmbogățirea în oxigen a atmosferei din vasele de cultură are efect benefic asupra culturilor de protoplaste. S-a demonstrat, de exemplu, că protoplastele mezofiliene de tomate și cele izolate din cotiledoane de iută, sau din suspensii celulare de orez, cultivate într-o atmosferă de 100% oxigen, au prezentat o capacitate mai bună de regenerare a coloniilor celulare, la toate speciile, comparativ cu martorul. Mai mult, la orez, oxigenarea stimulează și regenerarea de plante, din calusurile derivate din protoplaste (*d'Utra Vaz* și colab., 1992 citat de *Herman* 1995).
- ***Perfluorocarbonii*** – sunt compuși lichizi, inerți, care au capacitatea de a dizolva gazele respiratorii; astfel de compuși s-au dovedit utili în stimularea morfogenezei protoplastelor, fie separat, fie acționând sinergic cu surfactanți de tipul Pluronic F-68. Fiind compuși lichizi, nemiscibili cu soluțiile apoase, perfluorocarbonii pot fi recuperați și reutilizați (*Anthony* și colab., 1994; *Lowe* și colab., 1995).
- ***Hemoglobina*** – soluțiile de hemoglobină, de origine bovină, stabilizate (Erythrogen) 1:50 au stimulat rata de diviziune a protoplastelor de *Petunia*

hybrida, izolate din suspensii celulare (*Anthony* şi colab., 1997). Asemănător perfluorocarbonilor, care au rolul de trasportori ai gazelor respiratorii, hemoglobina stimulează capacitatea de diviziune a protoplastelor, în mod sinergic cu surfactantul Pluronic F-68. Dar, contrar perfluorocarbonilor, hemoglobina se dizolvă în soluţiile apoase, deci, ea se poate adăuga la mediul de cultură al protoplastelor. Hemoglobina adăugată în mediul de cultură lichid L4, a stimulat şi capacitatea de regenerare a coloniilor celulare din protoplaste de floarea soarelui, imobilizate în disc de alginat (*Aurori* şi colab., 1998).

- ***Surfactanţii ne-ionici*** – cum ar fi Pluronic F-68 0,1%, cresc eficienţa regenerării de colonii celulare din protoplaste la *Solanum dulcamara* (*Kumar* şi colab., 1991, citat de *Herman* 1995).
- ***Inhibitori ai etilenei*** – compuşi cum ar fi azotatul de argint sau clorura de cobalt sunt utilizaţi pentru a stimula organogeneza la nivelul calusului derivat din protoplaste. Astfel de compuşi, sunt extrem de utili, de exemplu, în regenerarea de plante din protoplaste de floarea soarelui, reducând vitrificarea plantulelor regenerate din acestea (*Krasnyanski* şi *Menzel*, 1993).

6.7. CRIOSTOCAREA PROTOPLASTELOR

Pentru păstrarea îndelungată, fie a protoplastelor, fie a culturilor organogene sau embriogene, derivate din acestea, se utilizează criostocarea (crioconservarea). Metodele de criostocare, aplicate protoplastelor, sunt asemănătoare celor utilizate pentru congelarea altor tipuri de explante cultivate *in vitro*, la -196^0 C, cum ar fi celule izolate sau suspensii celulare (*Bajaj*, 1988, *Cachiţă* şi colab., 1991). Criostocarea protoplastelor necesită prezenţa unui crioprotector sau a unui amestec crioprotector, care să asigure şi condiţiile de izoosmolaritate (*Steponkus*, 1985). Soluţiile crioprotectoare utilizate conţin: zaharoză, glicerină, PEG (polietilenglicol), sau ulei mineral.

Pentru protoplaste, tratamentul de îngheţare cel mai potrivit este cel de reducere treptată a temperaturii, cu $1\text{-}2^0$ C per minut, până la o temperatură de -30^0 C sau -40^0 C şi, apoi, plonjarea directă a suspensiei de protoplaste, în azot lichid. Acest tratament de îngheţare, alături de crioprotectori, previne formarea la nivelul protoplastelor a cristalelor de gheaţă, care sunt extrem de nocive, mai ales în cazul protoplastelor, care sunt înconjurate numai de plasmalemă. Pentru dezgheţare se utilizează un tratament de plonjare directă a suspensiei de protoplaste, aflată în recipientul de îngheţare, în baie de apă având o temperatură de 37^0 C.

După congelarea la -196^0 C protoplastele își păstrează totipotențialitatea, așa cum s-a demonstrat pentru protoplastele de morcov (*Takeuchi* și colab., 1980, 1982), fiind posibilă regenerarea din acestea a unor plante întregi, normal conformate, la *Nicotiana tabacum*, *Atropa belladona* sau *Datura innoxia* (*Bajaj*, 1988).

6.8. METODE DE IZOLARE ȘI DE CULTURĂ A PROTOPLASTELOR VEGETALE – EXEMPLE

6.8.1. Izolarea, cultura și regenerarea de plante din protoplaste mezofiliene, la soiuri diploide și tetraploide de cartof (*Solanum tuberosum* L.)

Cartoful poate fi considerat cea mai importantă plantă de cultură din genul *Solanum* ocupând, ca importanță economică, locul cinci între speciile cultivate pe glob (*Zuba* și *Binding*, 1989). Importanța economică a cartofului este, adeseori, subestimată, fiind considerat doar o sursă importantă de amidon. Nu trebuie să uităm însă că, tuberculii conțin și proteine bogate în principalii aminoacizi esențiali, unii dintre aceștia rar întâlniți în alte plante de cultură, la care se adaugă lipide și săruri minerale. Multiplicându-se vegetativ, cartoful este greu de ameliorat prin metodele clasice. Majoritatea soiurilor obținute prin încrucișare și retroîncrucișare, deși prezintă calități de producție remarcabile, sunt adeseori susceptibile la boli și dăunători. Ameliorarea cartofului se realizează pe baza metodei pedrigreelor. Soiurile selectate sau liniile ameliorate se retroîncrucișează, iar descendența, constând din 150.000 de plantule, se testează în câmp. Sunt necesari 8 - 10 ani de selecție continuă, pentru a obține 1 - 2 hibrizi F1 capabili să dea soiuri noi (*Mac Kay*, 1987). Strategia de ameliorare clasică necesită, prin urmare, un timp îndelungat.

Hibridarea somatică a cartofului, cu specii sălbatice aparținând genului *Solanum*, a fost și este considerată o alternativă promițătoare pentru introducerea în genofondul soiurilor cultivate a unor caractere de rezistență cu determinism poligenic (*Ferreira* și *Zelcer*, 1989). Izolarea și cultura protoplastelor de cartof, reprezintă o primă etapă esențială în realizarea hibridării somatice intra și interspecifice, sau o modalitate de a induce variabilitate protoclonală. Fenomenul de variabilitate genetică, indus de cultura protoplastelor *in vitro*, a fost descris, mai ales pentru soiuri tetraploide, dar și pentru unele linii dihaploide, precum și pentru mai mult de 30 de specii sălbatice, aparținând genului *Solanum* (*Ferreira* și *Zelcer*, 1989).

In acest subcapitol, vom prezenta rezultatele obținute în regenerarea plantelor din protoplaste mezofiliene de cartof, pentru soiul tetraploid Desirée

şi pentru linia dihaploidă 687061/1. Linia dihaploidă a fost obţinută prin partenogeneză, după încrucişarea soiului We 58.7/49 cu specia *Solanum phureja* la Institutul de Cercetare şi Producţie pentru Cultura Cartofului din Braşov (fiindu-ne oferită cu multă amabilitate de dr. *Traian Gorea*, căruia îi mulţumim şi pe această cale).

Izolarea protoplastelor

Materialul sursă pentru izolarea protoplatelor:

Sursa de izolare a protoplastelor au reprezentat-o plantulele micropropagate *in vitro*.

Soiul Desirée (2n = 4x = 48) s-a menţinut *in vitro* prin micropropagarea apexurilor, la interval de o lună, pe mediul RMB5, conţinând săruri minerale MS (*Murashige-Skoog*, 1962), vitamine B5 (*Gamborg*, 1968), zaharoză 10 g/l, agar 0,6 %, pH=5,8 (*Menczel* şi colab., 1981).

Pentru iniţirea culturilor *in vitro*, tuberculii liniei dihaploide 687061/1 (2n = 2x = 24) s-au cultivat în perlit, umectat cu apă de robinet. Lăstarii formaţi s-au sterilizat cu alcool 70 %, timp de 3 minute, procedură urmată de o sterilizare cu o soluţie de hipoclorit de sodiu 10 %, timp de 10 minute. După sterilizare, lăstarii s-au spălat de trei ori cu apă distilată, sterilă, într-o incintă cu flux laminar, orizontal, de aer steril. Fragmentele nodale s-au cultivat pe mediul MS săruri (*Murashige-Skoog*, 1962), conţinând 20 g/l zaharoză, 2,5 mg/l acid giberelic (GA3), solidificat cu 0,8 % agar (pH=5,6). Plantulele rezultate au fost propagate *in vitro*, pe mediul conţinând săruri minerale şi vitamine MS (*Murashige-Skoog*, 1962) la care s-au adăugat 10 g/l zaharoză şi 8 g/l agar, pH=5,8.

Vitroplantele utilizate ca sursă pentru izolarea protoplastelor, s-au menţinut într-o cameră de vegetaţie, având o fotoperioadă de 16 h, o temperatură de 25^{0}C /23^{0}C şi o intensitate luminoasă de 4000 lux. Pentru izolarea protoplastelor s-au utilizat frunzele vitroplantelor având 3 - 4 săptămâni de la ultima pasare, atât în cazul soiului Desirée, cât şi în cazul liniei dihaploide.

Macerarea ţesutului foliar

Izolarea protoplastelor soiului Desirée s-a făcut prin incubarea fragmentelor foliare, secţionate transversal, într-o soluţie de macerare conţinând:

- celulaza "Cellulase R-10" 1 %,
- pectinaza "Macerozyme R-10" 0,25 %,
- dizolvate în mediul W-S-S -i.m. (*Sidorov* şi colab., 1987), pH=5,8. Soluţia de enzime s-a sterilizat prin filtrare.

Incubarea în soluția de macerare s-a făcut la lumină difuză, fără agitare, timp de 18 h.

Pentru izolarea protoplastelor liniei dihaploide, frunzele secționate în fragmente transversale s-au incubat în soluția de macerare conținând:

- celulaza "Cellulase R-10" 1,5 %,
- pectinaza "Macerozyme R-10" 0,3 %, dizolvate în mediul W-S-S-i.m., pH=5,5.

Incubarea a durat 4 h, la lumină difuză, cu agitare la o turație de 8 - 10 rpm. Ambele soluții de enzime s-au centrifugat la 3.000 rpm, timp de 10 minute, pentru îndepărtarea reziduurilor nedizolvate, înaintea sterilizării prin filtrare. Sterilizarea soluției de macerare s-a realizat prin filtrare, prin trecerea prin filtre Millipore, având pori de 0,2µm.

Purificarea protoplastelor

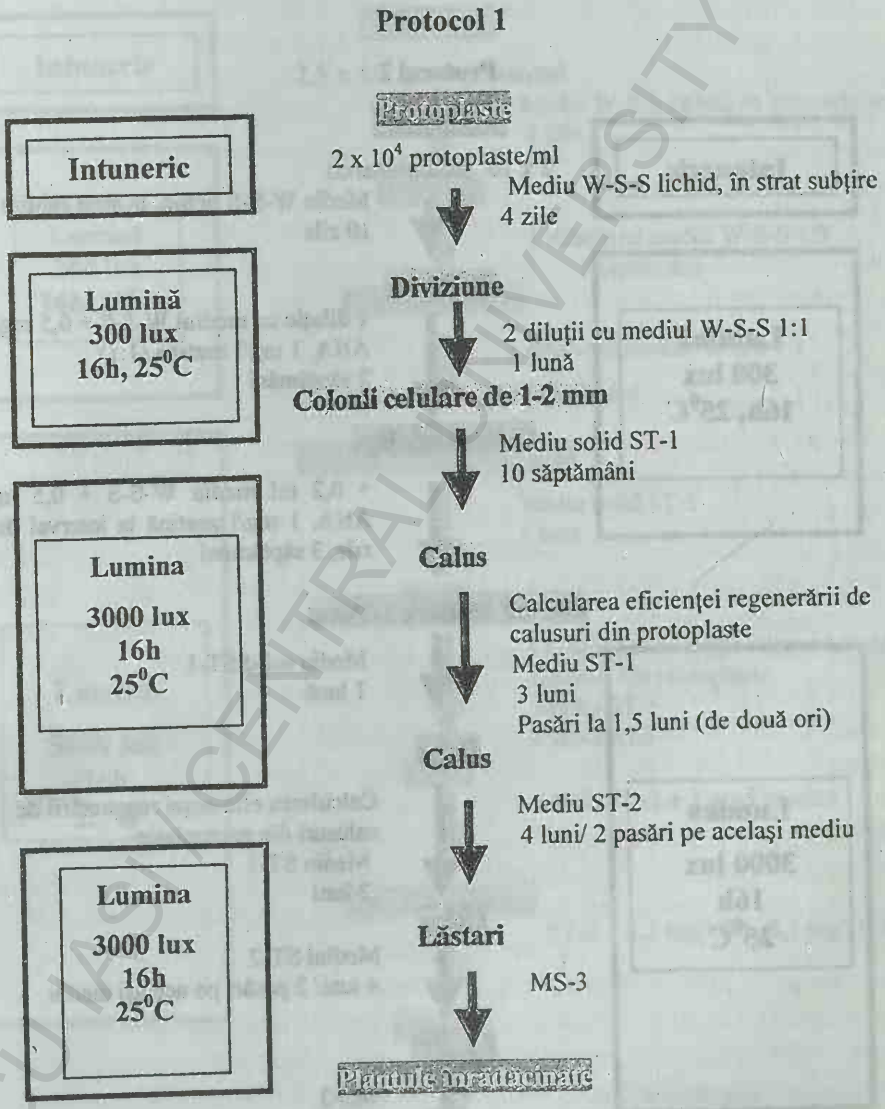
După incubarea în soluția de macerare, s-au îndepărtat prin filtrare, prin filtre de nylon având ochiuri de 100 µm, resturile de țesuturi nedigerate de amestecul enzimatic. In cazul soiului Desirée, protoplastele s-au separat, apoi, prin flotare centrifugându-se la 1500 rpm, timp de 5 minute. In acest mod, protoplastele integre, lipsite de perete celular, au format un strat inelar la suprafața soluției de macerare. Protoplastele s-au colectat şi s-au spălat, prin centrifugare, de două ori, cu soluție de sorbitol 0,5 M (pH=5,8), la o turație de 1000 rpm, timp de 3 minute fiecare.

In cazul liniei dihaploide de cartof, metoda de purificare a protoplastelor cuprinde aceleaşi etape, cu deosebirea că prima centrifugare se realizează la o turație de 800 rpm, timp de 5 minute, iar cele două spălări se efectuează folosind soluția W58MES (*Rakosy-Tican*, 1998), prin centrifugare la o turație de 500 rpm, timp de 3 minute.

Cultura de protoplaste

Pentru protoplastele mezofiliene de cartof soiul Desirée, s-au testat două metode de cultură, folosind seria de medii W-S-S, ST-1, ST-2 şi S-3 (*Sidorov* şi colab., 1987). Etapele de cultură a protoplastelor sunt redate în schemele de mai jos (schema 2, 3 şi 4). In cea de a doua variantă de cultură testată, redată în schema 3, pentru protoplastele mezofiliene de cartof soiul Desirée, la izolarea protoplastelor a existat următoarea diferență față de prima variantă: enzimele s-au dizolvat în soluția de săruri CPW, la care s-a adăugat zaharoză 0,4 M (pH=5,8).Pentru protoplastele liniei dihaploide de cartof 687061/1, testată în aceste experimente, protocolul experimental a urmat etapele descrise în schema 4.

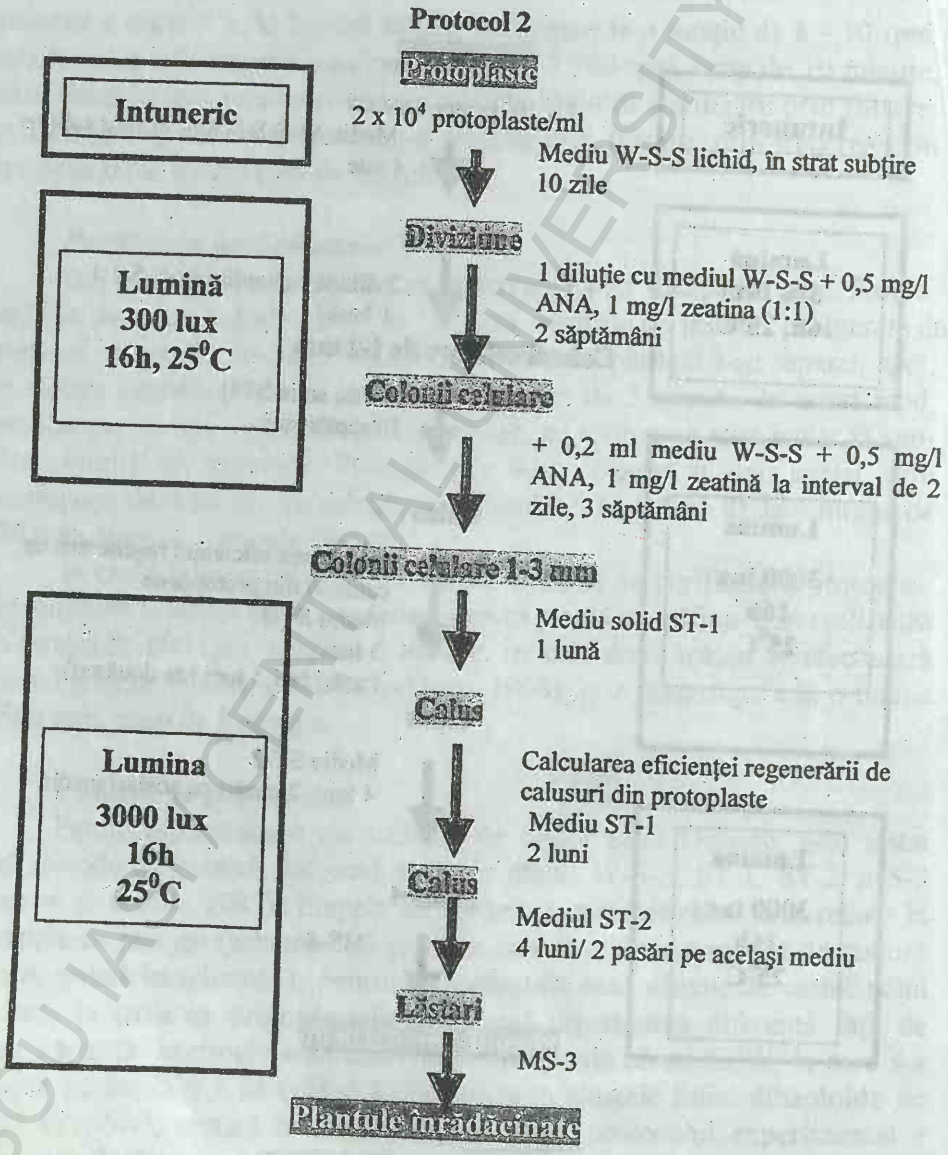
Schema 2. Reprezentarea schematică a etapelor de cultură a protoplastelor mezofiliene de cartof (*Solanum tuberosum* L.) soiul Desirée (4n)



BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

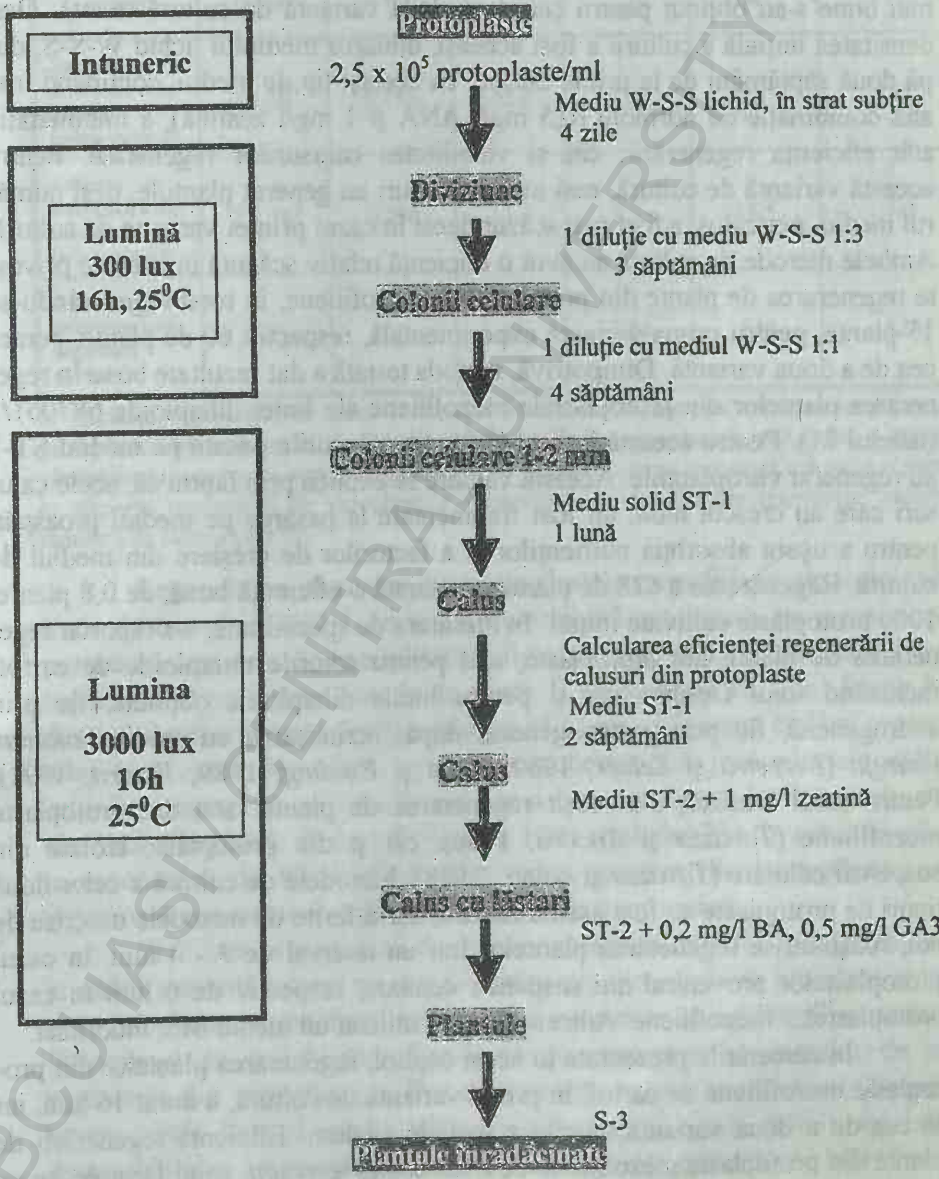
B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE

Schema 3. Reprezentarea schematică a etapelor de cultură a protoplastelor mezofiliene de cartof (*Solanum tuberosum* L.), soiul Desirée (4n)



BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Schema 4. Reprezentarea schematică a etapelor de cultură a protoplastelor mezofiliene de cartof (*Solanum tuberosum* L.) linia 687061/1 (2n)



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Regenerarea de vitroplante din protoplaste

Prin utilizarea metodelor descrise, s-a reuşit regenerarea de vitroplantule şi în final, de plante din protoplaste izolate din mezofilul foliar, atât pentru soiul tetraploid *Solanum tuberosum* L. Desirée, cât şi pentru linia dihaploidă de cartof 687061/1 (tabelul 21). In cazul soiului tetraploid de cartof, rezultate mai bune s-au obţinut pentru cea de a doua variantă de cultură testată. Deşi densitatea iniţială a culturii a fost aceeaşi, diluarea mediului lichid W-S-S, după două săptămâni de la prima diluţie, cu acelaşi tip de mediu, conţinând însă altă combinaţie de hormoni (0,5 mg/l ANA şi 1 mg/l zeatină), a îmbunătăţit, atât eficienţa regenerării, cât şi viabilitatea calusurilor regenerate. Pentru această variantă de cultură, mai multe calusuri au generat plantule, deşi numărul mediu, per calus, a fost mai scăzut decât în cazul primei variante de cultură. Ambele metode de cultură au avut o eficienţă relativ scăzută în ceea ce priveşte regenerarea de plante din protoplastele mezofiliene, în total regenerându-se 15 plante, pentru prima variantă experimentală, respectiv 60 de plante, pentru cea de a doua variantă. Dimpotrivă, metoda testată a dat rezultate bune în regenerarea plantelor din protoplastele mezofiliene ale liniei dihaploide 687061/1 (tabelul 21). Pentru această linie, 149 % din calusurile pasate pe mediul ST-1 au regenerat vitroplantule. Această valoare se explică prin faptul că, acele calusuri care au crescut mult, au fost fragmentate la pasarea pe mediul proaspăt, pentru a uşura absorbţia nutrienţilor şi a factorilor de creştere din mediul de cultură. Regenerarea a 628 de plante reprezintă o eficienţă bună, de 0,8 plante/1000 protoplaste cultivate iniţial. In literatura de specialitate, s-a raportat regenerarea de plante din protoplaste, atât pentru soiurile tetraploide de cartof, incluzând soiul Desirée, cât şi pentru liniile dihaploide obţinute, fie prin androgeneză, fie prin partenogeneză, după încrucişarea cu specia *Solanum phureja* (*Ferreira* şi *Zelcer*, 1989; *Zuba* şi *Binding*, 1989; *Waara*, 1991). Pentru soiul Desirée, s-a reuşit regenerarea de plante, atât din protoplaste mezofiliene (*Tavazza* şi *Ancora*, 1986), cât şi din protoplaste izolate din suspensii celulare (*Tavazza* şi colab., 1988). Metodele de cultură a celor două tipuri de protoplaste au fost asemănătoare, dar diferite de metodele descrise de noi, reuşindu-se regenerarea plantelor într-un interval de 3 - 4 luni, în cazul protoplastelor provenind din suspensii celulare, respectiv de 6 luni în cazul protoplastelor mezofiliene. Autorii citaţi au utilizat un mediu MS, modificat.

In cercetările prezentate în acest capitol, regenerarea plantelor din protoplaste mezofiliene de cartof, în prima variantă de cultură, a durat 16 luni, iar în cea de a doua variantă, durata a fost de 14 luni. Eficienţa regenerării de plante din protoplaste mezofiliene de *Solanum tuberosum*, soiul Desirée, se va putea îmbunătăţi prin optimizarea în continuare a condiţiilor de cultură.

Tabelul 21. Eficienţa regenerării protoplastelor mezofiliene de cartof (*Solanum tuberosum* L.) soiul Desirée şi linia dihaploidă 687061/1

Soiul sau linia testată (varianta de cultură)	Densitate iniţială (protoplaste / ml)	Eficienţa regenerării calusului (%[a])	Viabilitatea calusurilor (%)	Număr mediu de vitroplantule per calus[b]	Eficienţa regenerării plantelor (%[c])	Număr total vitroplantule regenerate
Solanum tuberosum soiul Desirée (prima variantă)	2×10^4	0,188	20,8	1,5	0,1	15
Solanum tuberosum soiul Desirée (a-2-a variantă)	2×10^4	0,498	33,3	1,1	15,5	60
Solanum tuberosum linia dihaploidă 687061/1	$1,8 \times 10^5$	7,5	43	5,24	149	628

a: eficienţa regenerării de calus = număr de calusuri regenerate, raportat la numărul de protoplaste cultivate iniţial (în %); b: număr mediu de vitroplantule per calus = număr de vitroplantule regenerate, raportat la numărul de calusuri care au regenerat cel puţin o plantulă; c: eficienţa regenerării de vitroplantule = numărul de vitroplantule regenerate, raportat la numărul de calusuri (în %).

Regenerarea plantelor din protoplastele mezofiliene ale liniei dihaploide de cartof 687061/1, linie de proveniență autohtonă, nu a mai fost raportată în literatura de specialitate. Eficienţa regenerării de plantule din protoplastele acestei linii dihaploide poate fi considerată ca fiind foarte bună, dar durata regenerării a fost prea lungă (12 luni). Eficienţa etalării protoplastelor (procentul de colonii celulare regenerate din protoplastele cultivate iniţial) se compară cu valorile cele mai bune raportate în literatură, pentru alte linii dihaploide de cartof (*Waara*, 1991) (tabelul 21). In schimb, eficienţa regenerării de vitroplantule din calus, generat din protoplaste, a fost superioară rezultatelor raportate de autoarea menţionată.

Stabilirea protocolului de regenerare a plantelor din protoplaste izolate la cartof, prezintă interes nu numai pentru experimentele de hibridare somatică şi de transformare genetică, dar şi pentru inducerea ***variabilităţii protoclonale***. Fenomenul de variabilitate fenotipică şi genotipică a plantelor de cartof regenerate din protoplaste, a fost demonstrat de mulţi cercetători (*Shepard* şi colab., 1980; *Karp* şi colab., 1982; *Sree Ramulu* şi colab., 1983), subliniindu-se posibilitatea selectării unor clone cu rezistenţă crescută la boli. Cu toate acestea, metoda fiind laborioasă, se preferă utilizarea unor metode mai rapide,

cum ar fi transformarea cu ajutorul genelor care codifică proteinele capsidale ale virusului X al cartofului (vezi *Rakosy-Tican* şi *Dinu*, 1996).

Pe de altă parte, regenerarea plantelor din protoplastele liniilor dihaploide de cartof este importantă, în perspectiva obţinerii de hibrizi somatici inter sau intraspecifici tetraploizi, fie prin fuziunea protoplastelor acestora cu protoplaste ale unor specii sălbatice diploide, fie cu protoplaste ale altei linii dihaploide. Revenirea la starea tetraploidă, prin fuziunea protoplastelor unor linii diploide, a fost propusă, de exemplu, de *Wenzel* (1979), ca o etapă într-o schemă complexă de ameliorare a cartofului, incluzând metode clasice de ameliorare, alături de metode moderne, biotehnologice. Mai recent, rezultate încurajatoare în hibridarea somatică intraspecifică a cartofului au fost obţinute de *Waara* (1991) şi *Mollers* şi *Wenzel* (1991).

6.8.2. Izolarea, cultura şi regenerarea plantelor din protoplaste izolate din suspensii celulare de *Nicotiana africana* Merxm.

Specia *Nicotiana africana* Merxm. (2n = 46) a fost descoperită relativ recent (*Merxmuller* şi *Buttler*, 1975), afinităţile sale taxonomice fiind, deocamdată, obscure. Studiile de citologie şi cele de biochimie au sugerat afinităţi ale acestei specii cu grupul Suaveolentes - grup răspândit în Australia. Datorită acestor afinităţi, *Kumashiro* şi colaboratorii (1988), au considerat această specie ca fiind o sursă posibilă de androsterilitate citoplasmatică realizând hibridarea somatică asimetrică a acestei specii cu tutunul. Autorii amintiţi au obţinut plante hibride asimetrice, androsterile, prin fuziunea protoplastelor mezofiliene de *Nicotiana africana*, iradiate cu raze X, cu protoplaste mezofiliene de tutun, neiradiate. Specia *N. africana* prezintă, de asemenea, rezistenţă la virusul Y al cartofului (PVY) (*Lucas* şi colab., 1980), caracter cu determinism genetic nuclear.

Izolarea protoplastelor

Obţinerea materialului sursă pentru izolarea protoplastelor

Seminţele speciei *N. africana* Merxm. s-au sterilizat prin imersare în alcool 95 %, timp de 30 s, spălare în hipoclorit de sodiu 10 %, timp de 30 minute, urmate de 3 - 4 spălări cu apă distilată sterilă. Plantulele regenerate prin germinarea seminţelor *in vitro*, s-au micropropagat pe acelaşi mediu conţinând săruri minerale MS (*Murashige-Skoog*, 1962), 10 g/l zaharoză şi 0,6 % agar, pH=5,8. Fragmentele foliare, având aproximativ 5 mm/5 mm, s-au cultivat pe mediul RMG, pentru inducerea formării de calus. Mediul RMG a conţinut: săruri MS, 100 mg/l mezo-inozitol, 1 mg/l vitamina B1, 20 g/l zaharoză, 1 mg/l 6-benziladenină (BA) şi 1 mg/l acid α - naftilacetic, pH=5,8. Calusul regenerat

la întuneric, la o temperatură de 25^0C / 26^0C, s-a transferat pe mediul lichid, pentru obținerea de suspensii celulare. Pentru inițierea și menținerea suspensiilor celulare s-a utilizat mediul MA-1 (*Rakosy-Tican*, 1998).

Suspensiile celulare s-au subcultivat la intervale de 7 zile, raportul între suspensie și mediul proaspăt fiind 20 ml/20 ml, la prima pasare, respectiv, 10 ml/40 ml, la următoarele pasări. După o lună de la inițierea suspensiilor de *N. africana,* acestea au devenit "apte" pentru izolarea protoplastelor. Suspensiile celulare s-au menținut pe agitator, la o turație de 119 rpm, la o temperatură de 25^0C/26^0C și la lumină având o fotoperioadă de 16 h și o intensitate de 500 lux.

Izolarea protoplastelor: s-au utilizat suspensii celulare având 3 - 4 zile de la ultimul lor transfer pe mediul proaspăt. Agregatele celulare s-au separat de mediul de cultură prin centrifugare la o turație de 1.000 rpm timp de 3 minute, mediul fiind înlocuit cu soluția de macerare, sterilizată prin filtrare. Soluția de macerare a conținut:

- celulaza "Cellulase R-10" 1 %,
- "Driselase" 0,2 %,
- "Pectolyase Y-23" 0,02 % dizolvate în mediul K3 (*Nagy* și *Maliga*, 1976), conținând 0,4 M zaharoză, pH=5,6.

Incubarea țesuturilor în soluția de macerare s-a făcut la lumină difuză, fără agitare, timp de 20 h.

Purificarea protoplastelor

După incubarea suspensiilor celulare în soluția de macerare, s-au îndepărtat agregatele celulare, prin filtrare, prin filtru de nylon, având ochiuri de 100 μm. Protoplastele s-au separat de resturile celulare, formând un inel la suprafața soluției de macerare, după o centrifugare la o turație de 1500 rpm, timp de 5 minute. După separare, protoplastele s-au spălat de două ori cu soluție de săruri W5 (*Menczel* și colab., 1981), prin recentrifugare la o turație de1000 rpm, timp de 3 minute.

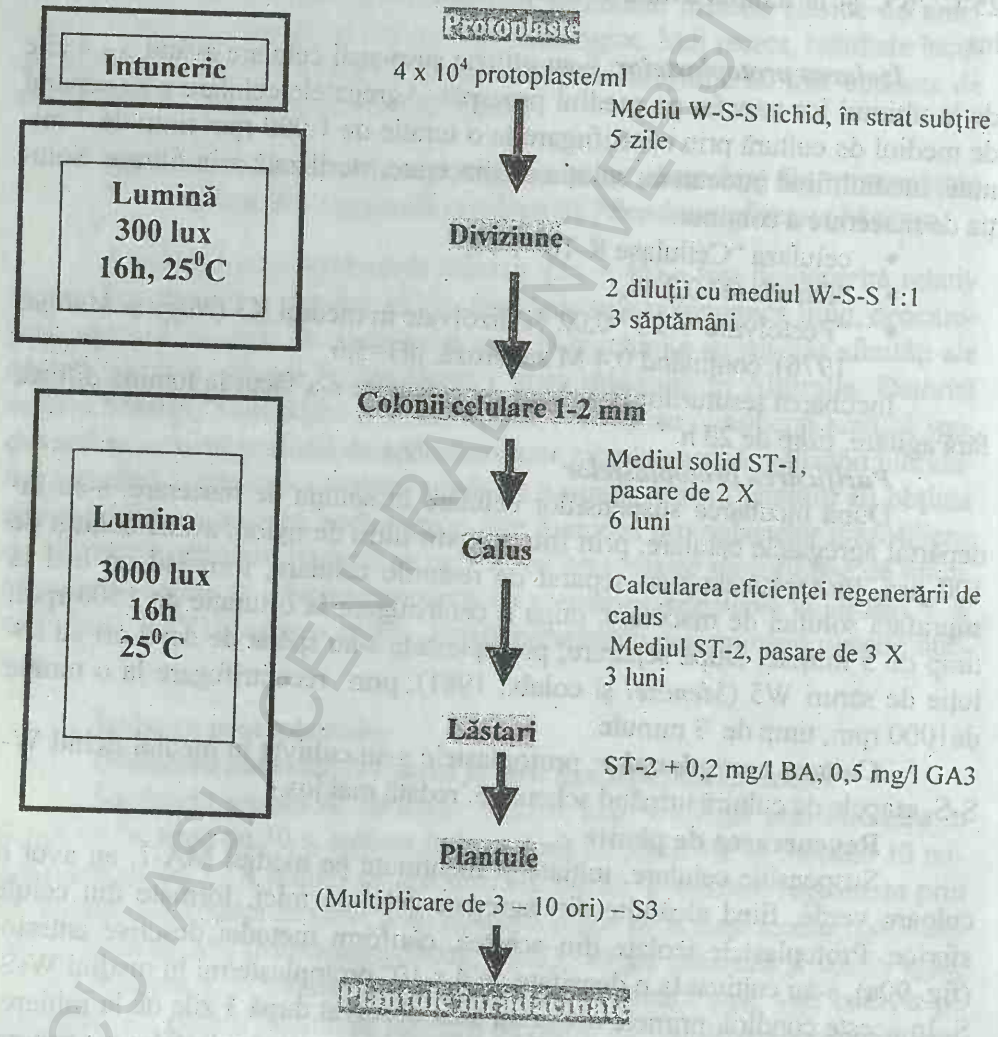
Cultura protoplastelor: protoplastele s-au cultivat în mediul lichid W-S-S, etapele de cultură urmând schema 5, redată mai jos.

Regenerarea de plante

Suspensiile celulare, inițiate și menținute pe mediul MA-1, au avut o culoare verde, fiind alcătuite din agregate celulare mici, formate din celule sferice. Protoplastele izolate din acestea, conform metodei descrise anterior (fig. 90a), s-au cultivat la o densitate de 4×10^4 protoplaste/ml în mediul W-S-S. In aceste condiții, primele diviziuni s-au observat după 3 zile de la inițierea culturii de protoplaste. In mediul W-S-S, majoritatea protoplastelor au generat colonii, neobservându-se celule mari, incapabile de diviziune. Coloniile

celulare, regenerate în mediul W-S-S, au format, pe mediul ST-1, un calus de culoare verde, foarte friabil. Acest calus a fost pasat, de 2 ori, pe mediul ST-1. După 10 luni de la inițierea culturii, s-au observat primele semne de morfogeneză la nivelul calusului regenerat din protoplaste (fig. 90). Eficiența regenerării de calus s-a determinat pe mediul ST-1, iar eficiența regenerării vitroplantulelor după transferul pe mediul ST-2 cu fitohormoni modificați.

Schema 5. Reprezentarea schematică a etapelor de cultură a protoplastelor izolate din suspensii celulare de *Nicotiana africana*



BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Etapele regenerării din protoplaste izolate din suspensii celulare de *N. africana* sunt ilustrate în fig. 90. De remarcat faptul că, vitroplantulele transferate pe mediul S-3, pentru dezvoltarea sistemului radicular şi creşterea lăstarilor, au prezentat o multiplicare de 3 - 10 ori, cu alte cuvinte, la colet s-au format între 3 şi 10 lăstari noi. S-au observat, de asemenea, vitroplantule prezentând o morfologie anormală - frunze vitrificate, contorsionate etc.

Pornind de la o cultură de protoplaste, prin subcultivări succesive, s-au obţinut 250 de vitroplantule care au fost multiplicate, în continuare, pe mediul S-3. Eficienţa regenerării de plante a fost de 27%, dacă se raportează la numărul de calusuri regenerate, respectiv, de 6,25 plante/1000 protoplaste cultivate, ceea ce se înscrie în intervalul considerat optim pentru regenerarea de plante, din protoplaste, şi anume de 1 - 10 plante /1000 protoplaste cultivate iniţial.

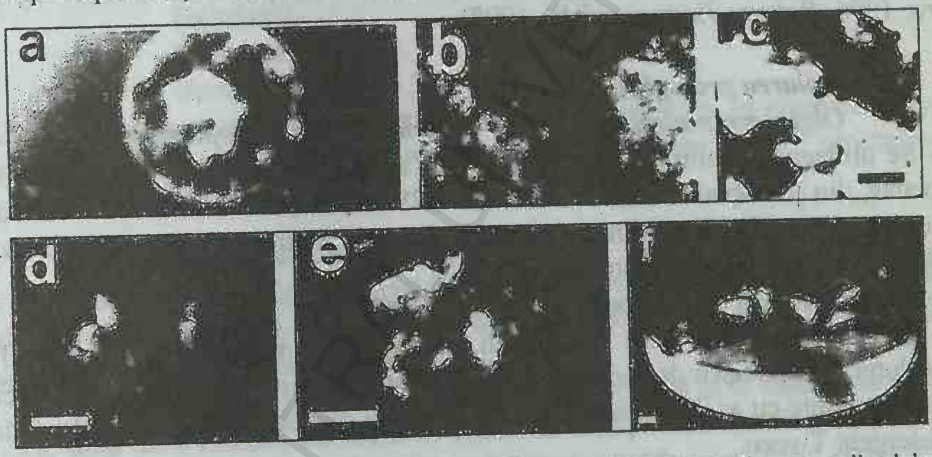


Fig. 90. Etapele de regenerare a vitroplantulelor din protoplaste izolate din suspensii celulare de *Nicotiana africana* Merxm.: **a)** protoplast izolat (bara = 10 μm); **b)** colonii celulare regenerate din protoplaste (bara = 40 μm); **c)** calus regenerat din protoplaste (bara = 1 cm); **d)** şi **e)** lăstari regeneraţi la nivelul fragmentelor de calus (bara = 1 cm); **f)** vitroplantule regenerate şi înrădăcinate pe mediul S-3 (bara = 1 cm)

De menţionat faptul că, deşi specia *N. africana* Merxm. a fost utilizată, după cum s-a mai arătat, într-un experiment de hibridare asimetrică cu *N. tabacum* (*Kumashiro* şi colab., 1988), după cunoştinţele noastre, nu s-a raportat regenerarea de plante din protoplaste de *N. africana* Merxm. Autorii menţionaţi au utilizat protoplaste mezofiliene de *N. africana* Merxm., care au fost iradiate cu raze X (10 kR). Pentru protoplastele martor, neiradiate, se menţionează formarea unor colonii celulare de culoare verde, dar nu şi regenerarea de plante (vezi *Rakosy-Tican* şi *Menczel*, 1998).

6.8.3. Izolarea, cultura şi regenerarea de plante din protoplaste de hipocotil, la floarea soarelui

Floarea soarelui ocupă locul patru, ca importanţă economică, între plantele oleaginoase cultivate pe glob. La noi în ţară, floarea soarelui se cultivă pe scară largă, fiind cea mai importantă plantă oleaginoasă. In pofida importanţei sale şi a preocupării deosebite a biotehnologiei moderne pentru aceasta specie, cultura *in vitro* a florii soarelui a întâmpinat dificultăţi deosebite. Regenerarea de plante din explante tisulare, este dependentă de genotip şi, la această specie puţine explante prezintă potenţial regenerativ. Mai mult, cultura şi regenerarea protoplastelor este şi ea dependentă de genotip, iar eficienţă regenerării plantelor este foarte scăzută, chiar şi pentru soiurile care dau rezultate mai bune (*Fischer* şi colab., 1992, 1996; *Krasnyanski* şi *Menczel*, 1993; *Lapara*, 1996, *Rakosy-Tican* şi colab., 1998).

Izolarea protoplastelor:

Obţinerea materialului sursă pentru izolarea protoplastelor

- Se utilizează seminţele unor soiuri care au dat rezultate în regenerarea de plante, din protoplaste, cum ar fi Florom 328 (hibrid produs de ICCPT Fundulea) sau linia 47302bcd (linie obţinută în Franţa); pentru o izolare se utilizează 40 seminţe (10 seminţe/borcan).
- Se îndepărtează endocarpul.
- Se sterilizează seminţele: 1 minut în alcool 70%, 5 minute în "eau de Javel" (soluţie de hipoclorit de sodiu) sau 7% Domestos, cu infiltrare la vid, apoi încă 20 de minute cu acelaşi detergent, decolorant, la care se adaugă 1-2 picături de detergent Tween.
- Seminţele se spală, de 5 ori, cu apă sterilă şi se îmbibă în apă, timp de 6 h până la 24 h.
- Se inoculează seminţele în borcane, conţinând mediul MS 1/2 (cu 10 g/l zaharoză şi 7 g/l agar, pH=5,6).
- Se menţin culturile 6 zile, la întuneric, la o temperatură de 26°C.

Izolarea protoplastelor

Pentru izolarea protoplastelor se utilizează hipocotile colectate de la plantulele cultivate *in vitro* timp de 6 zile, care se secţionează în fragmente longitudinale, foarte subţiri (2 g ţesut de hipocotil, la 10 ml soluţie de enzime). Secţiunile de hipocotile se transferă în soluţie S, pentru preplasmolizarea ţesuturilor (timpul de preplasmoliză să nu depăşească 30 minute).

Soluția S: KCl 334 mM
$CaCl_2 \times 2H_2O$ 14 mM
MES 5 mM
pH=5,6 - 5,7;
650-700 mOsmol

Se înlocuieşte soluția S cu soluția de enzime (sterilizată prin filtrare) şi probele se incubează la o temperatură de 25°C, timp de 16 h, la întuneric;

Soluția de enzime:
Macerozyme (pectinază) 0,1%
Cellulase Onozuka R10 (celulază) 0,5%
Driselase 0,13%
dizolvate în soluție S, pH=5,6

După depăşirea timpului de incubare în soluția de macerare, se efectuează observații la microscopul inversat, pentru a stabili eficiența izolării protoplastelor.

Purificarea protoplastelor:

Se filtrează soluția rezultată în urma digestiei enzimatice printr-un strat de vată hidrofilă, sterilă. Se îndepărtează, astfel, atât resturile de țesuturi "nedigerate", cât şi resturile celulare.

Soluția colectată după filtrare, se centrifughează la o turație de 1200 rpm, timp de 5 minute. Reziduul se spală, de 2 ori, cu soluție S (prin centrifugare la 1200 rpm, 5 minute) şi se numără protoplastele cu ajutorul hemocitometrului (la 1 sau 2 ml suspensie).

Se resuspendă protoplastele într-o soluție de manitol (sau sorbitol) 0,6 M, la o densitate finală de 10^5 protoplaste/ml.

Se amestecă suspensia de protoplaste cu un volum egal de soluție de alginat de sodiu conținând: alginat de sodiu (Protanal, Norvegia) 2% dizolvat (la cald) în 0,5 M manitol (sau sorbitol).

Se pipetează volume de 1 ml din acest amestec pe suprafața unui mediu solid conținând: $CaCl_2$ 50 mM, manitol (sau sorbitol) 0,4 M şi agar 1%. Se incubează, în incinta cu flux laminar de aer steril, timp de 1 h.

Se transferă discul de alginat rezultat, în mediul de cultură lichid corespunzător protocolului de cultură (vezi schemele 6 şi 7).

Metode pentru cultura protoplastelor şi regenerarea de plante

Se pot utiliza, pentru cultura de protoplaste şi regenerarea plantelor două metode de cultură: protocolul experimental descris de *Fischer* şi colaboratorii (1992), sau protocolul descris de *Krasnyanski* şi *Menczel* (1993) – care sunt redate schematic mai jos (schemele 6 şi 7). Pentru cultivarea protoplastelor de floarea soarelui este esenţială imobilizarea lor fie în mediul solidificat cu alginat, fie în mediul solidificat cu agaroză. In experimentele prezentate, protoplastele au fost imobilizate în disc de alginat. Protoplastele izolate din hipocotile, sau din cotiledoane, încep să se dividă după câteva zile de cultură. Primele diviziuni au loc fără o creştere a volumului protoplastelor, iar pereţii celulari, dintre celulele fiice, sunt mai greu de observat la microscop, fără o colorare specifică. Pentru compoziţia mediilor de cultură vezi *Rakosy-Tican* (1998 b).

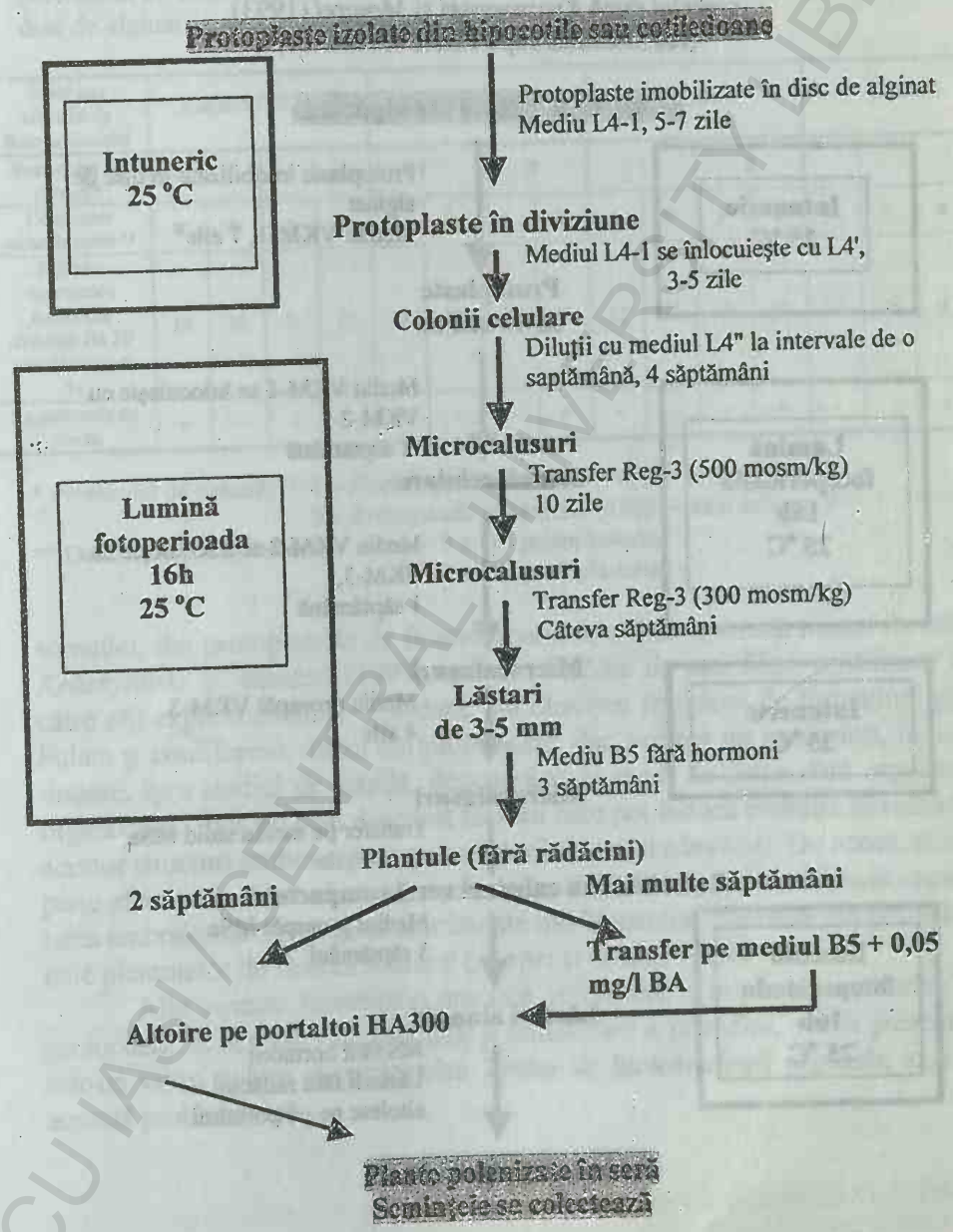
Regenerarea de plante din protoplaste

Capacitatea morfogenetică a protoplastelor, izolate din hipocotile de floarea soarelui, variază în funcţie de genotip, protocolul de cultură şi densitatea iniţială a acestora, în discul de alginat. Spre deosebire de rezultatele raportate de *Krasnyanski* şi *Menczel* (1993), protoplastele cultivate în mediul VKM, la o densitate de $5x10^4$ protoplaste/ml, nu au format colonii multicelulare. In schimb, eficienţa regenerării coloniilor celulare ("plating efficiency"), la 20 de zile de cultură, a fost mai mare pentru toate genotipurile testate, atunci cînd densitatea iniţială a protoplastelor în discul de alginat, a fost de 8×10^5 protoplaste/ml (tabelul 22).

Toate genotipurile testate care au regenerat colonii celulare, au generat şi calus. In culturile de calus, derivate din colonii celulare provenind din protoplaste, s-au evidenţiat atât zone de calus verde, foarte compact, cât şi calus alb, friabil. Numai calusul verde, compact, a prezentat capacitate organogenetică. Mai mult, vitroplantulele regenerate, au provenit din microcalusurile formate în discul de alginat, înaintea transferului pe mediul solid MSa, sau pe mediul Reg-3 (schemele 6 şi 7). S-au regenerat plante, în cazul hibridului Florom 328, pentru două variante de cultură, respectiv în cazul hibridului Turbo, pentru protocolul descris de *Krasnyanski* şi *Menczel* (1993), atunci când protoplastele au fost cultivate la o densitate iniţială de 8×10^5 protoplaste/ml (tabelul 22).

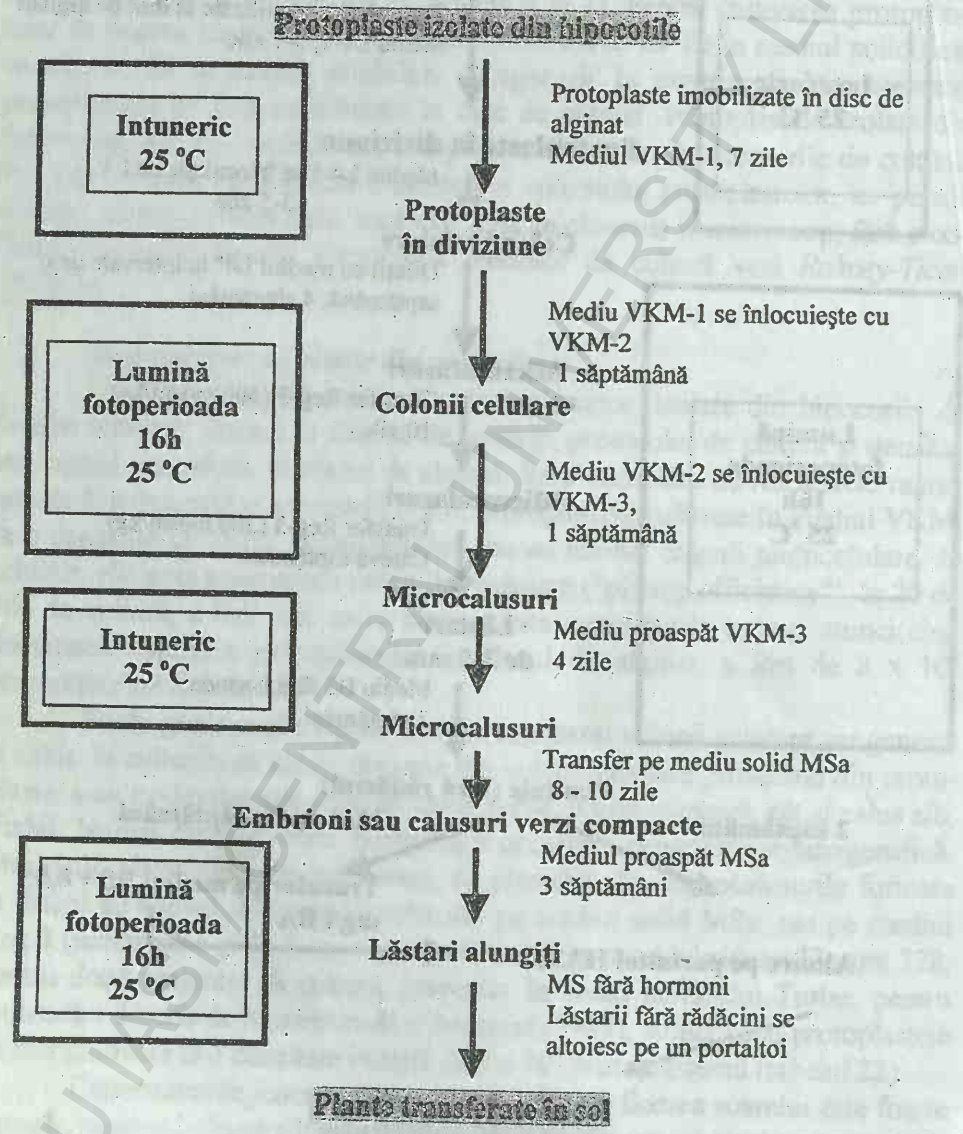
Capacitatea regenerativă a protoplastelor de floarea soarelui este foarte scăzută, regenerându-se câteva plantule, per experiment, chiar şi pentru soiurile care răspund pozitiv. Acest impediment trebuie depăşit, prin înţelegerea mecanismelor care inhibă organogeneza. Pe de altă parte, regenerarea via embrioni

Schema 6. Reprezentarea etapelor de regenerare a protoplastelor de floarea soarelui după *Fischer* şi colaboratorii (1992) (modificată)



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Schema 7. Reprezentarea etapelor de regenerare a protoplastelor de floarea soarelui după *Krasnyanski* şi *Menczel* (1993) (reconstituită după datele din lucrare)



BCU MS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 22. Eficienţa regenerării de colonii celulare, respectiv de plante din protoplaste izolate din hipocotile de floarea soarelui, în funcţie de genotipul, de protocolul de cultură utilizat şi de densitatea iniţială a protoplastelor, imobilizate în disc de alginat

Soiul sau hibridul de floarea soarelui	Linia 47302bcd				Florom 328				Turbo				Select			
Protocolul de cultură*	1		2		1		2		1		2		1		2	
Densitatea protoplastelor**	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Eficienţa regenerării coloniilor celulare (la 20 zile de cultură) %	14	38	0	32	24	33	0	35	12	31	0	29	15	35	0	33
Regenerarea de plante	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

* Protocolul de cultură: 1 – *Fischer* şi colaboratorii (1992)– vezi schema 6
2 – *Krasnyanski* şi *Menczel* (1993) – vezi schema 7

** Densitatea protoplastelor: a – 5×10^4 protoplaste/ml
b – 8×10^5 protoplaste/ml.

somatici, din protoplastele de floarea soarelui, a fost raportată numai de către *Krasnyanski* şi *Menczel* (1993), aceste rezultate ne mai fiind confirmate de către alţi experimentatori. Totodată, s-a observat formarea de formaţiuni globulare şi cordiforme, direct din protoplaste; dar, acestea nu evoluează, în continuare, spre stadiul de torpilă, degenerând în mase de calus, fără capacitate organogenă. Incă nu s-au descifrat factorii care pot induce evoluţia în cultură a acestor structuri embrionare spre embrioni somatici adevăraţi. De aceea, se impune efectuarea de studii fundamentale, aprofundate, pentru a stimula capacitatea embriogenă a protoplastelor izolate din hipocotile, eventual din cotiledoanele plantulelor de floarea soarelui (*Aurori* şi colab., 1998).

Alte aspecte, teoretice şi practice, referitoare la implicarea culturilor de protoplaste în cercetări de genetică şi ameliorare a plantelor, vor fi prezentate într-un viitor volum al prezentului ***Tratat de biotehnologii vegetale***, axat pe această problematică.

BIBLIOGRAFIE

Ahuja, P.S., Hadiuzzaman, S., Davey, M.R., Cocking, E.C., 1983, Prolific plant regeneration from protoplast-derived tissues of *Lotus corniculatus* L. (Birdsfoot Trefoil). Plant Cell Rep., 2, p. 101 - 104.

Anthony, P., Davey, M.R., Power, J.B., Washington, C., Lowe, K.C., 1994, Synergistic enhancement of protoplast growth by oxygenated perfluorocarbon and Pluronic F-68. Plant Cell Rep., 13, p. 251-255.

Anthony, P., Lowe, K.C., Davey, M.R., Power, J.B., 1997, Strategies for promoting division of cultured plant protoplasts: synergistic beneficial effects of haemoglobin (Erythrogen) and Pluronic F-68. Plant Cell Rep., 17, p. 13-16.

Arnold, S. von, Eriksson, T., 1977, A revised medium for growth of pea mesophyll protoplasts. Physiol. Plant, 39, p. 257 - 260.

Aurori, A., Rakosy-Tican, L., Morariu, V.V., 1998, Searching for new ways to stimulate sunflower protoplast regeneration. In: *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*. III. (ed. Crăciun, C., Ardelean, A.). Ed. Risoprint Cluj-Napoca, p. 497-500.

Aurori, A., Rakosy-Tican, L., Comşa, D., Kreibik, S., 1999, Studii preliminare asupra electrostimulării calusului de floarea soarelui. In: *Culturi "in vitro" la cormofite* (ed. Cachiţă, C.D., Ardelean, A., Crăciun, C.). Ed. Risoprint Cluj-Napoca, p. 292-296.

Bajaj, Y.P.S., 1988, Regeneration of plants from frozen (-196^0 C) protoplasts of *Atropa belladonna*, *Datura innoxia* and *Nicotiana tabacum*. Indian J. Exp. Biol., 26, p. 289-292.

Barth, S., Voeste, D., Wingender, R., Schnabl, H., 1993, Plantlet regeneration from electrostimulated protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Botanica Acta, 106, p. 220-222.*

Bhojwani, S.S., Power, J.B., Cocking, E.C., 1977, Isolation, culture and division of cotton callus protoplasts. Plant Sci. Lett., 8, p. 85 - 89.

Binding, H., 1974 a, Cell cluster formation by leaf protoplasts from axenic cultures of haploid *Petunia hybrida* L. Plant Sci. Lett., 2, p. 185 - 188.

Binding, H., 1974 b, Regeneration von haploiden und diploiden Pflanzen aus Protoplasten von *Petunia hybrida* L. Z. Pflanzenphysiol., 74, p. 327 - 356.

Binding, H., Nehls, R., 1977, Regeneration of isolated protoplasts to plants in *Solanum dulcamara* L. Z. Pflanzenphysiol., 85, p. 279 - 280.

Binding, H., Nehls, R., 1978, Regeneration of isolated protoplasts of *Vicia faba* L. Z. Pflanzenphysiol., 88, p. 327 - 332.

Binding, H., Kollmann, R., 1985, Regeneration of protoplasts. In :*In vitro techniques. Propagation and long term storage*. Proc. of a seminar in the CEC programme of coordination of research on plant productivity. (ed. Schafer-Menuhr, A.) Braunschweig 1984. Nijhoff, Junk, Dordrecht, Boston, Lancaster, p. 93 - 99.

Bornman, C.H., Bornman, J.F., 1985, Plant protoplast viability. In: *The Physiological Properties of Plant Protoplasts*. (ed. Pilet, P.E.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 29-36.

Bourgin, J.P., Chupeau, Y., Missionier, C., 1979, Plant regeneration from mesophyll protoplasts of several *Nicotiana* species. Physiol. Plant., 45, p. 288 - 292.

Boyes, C.J., Zapata, F.J., Sink, K.C., 1980, Isolation, culture and regeneration to plants of callus protoplasts of *Salpiglossis sinuata* L. Z. Pflanzenphysiol., 99, p. 471 - 474.

Brenneman, F.N., Galston, A.W., 1975, Experiments on the cultivation of protoplasts and calli of agriculturally important plants. 1. Oat (*Avena sativa* L.). Biochem. Physiol. Pflanzen, 168, p. 453 - 471.

Brezeanu, A., Anghel, I., Vassu, T., 1988, Aplicaţii ale protoplaştilor în biotehnologii. In. *Inginerie genetică – note de curs.* (ed. Anghel I.), Universitatea din Bucureşti, Bucureşti, p. 198-308.

Caboche, M., 1980, Nutritional requirements of protoplast-derived, haploid tobacco cells grown at low cell densities in liquid medium. Planta, 149, p. 7 - 18.

Cachiţă, C.D., Zăpîrţan, M., Crăciun, C., Rakosy-Tican L., Vicol, A., Cristea, V., Varga, P., Crăciun, V., 1991, The response of various types of cormophytoinocula to cryopreservation (-196°). In: *"In vitro" Explant Cultures, Present and Perspective.* In: *The IVth National Symposium on Plant Cell and Tissue Culture.* (ed. Cachiţă, D.), Cluj-Napoca, p. 90 - 92.

Cocking, E.C., 1960, A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature (London), 187, p. 927-929.

Constabel, F., Kirkpatrick, J.W., Gamborg, O.L., 1973, Callus formation from mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. Can. J. Bot., 51, p. 2105-2106.

Crepy, L., Chupeau, M.-C., Chupeau, Y., 1982, The isolation and culture of leaf protoplasts of *Cichorium intybus* and their regeneration into plants. Z. Pflanzenphysiol., 107, p. 123 - 131.

Dai, C., Mertz, D., Lambeth, V., 1987, Improved procedure for the isolation and culture of potato protoplasts. Plant Sci., 50, p. 79 - 84.

Davey, M.R., 1983, Recent developments in the culture and regeneration of plant protoplasts. In: *Protoplasts 1983*. Proc. 6th Intl. Protoplast Sympos., Experientia Suppl., 46, p. 19 - 29.

Davey, M.R., Blackhall, N.W., Lowe, K.C., Power, J.B., 1996, Stimulation of plant cell division and organogenesis by short-term, high-voltage electrical pulses. In: *Electrical manipulation of cells.* (ed. Lynch, P.T., Davey, M.R.), Chapman&Hall, New York, p. 273-286.

Dons, J.J.M., Bouwer, R., 1986, Improving the culture of cucumber protoplasts by using an agarose-disc procedure. In: Proc. Intl. Sympos. On Nuclear Techniques and *In Vitro* Culture for Plant Improvement – IAEA, Vienna, p. 496-504.

Draget, K.I., Myrhe, S., Skjak-Braek, G., Ostgaard, K., 1988, Regeneration, cultivation and differenciation of plant protoplasts immobilized in Ca-alginate beads. J. Plant Physiol., 132, p. 552-556.

Durand, J., Potrykus, I., Donn, G., 1973, Plantes issues de protoplastes de *Petunia*. Z. Pflanzenphysiol., 69, p. 26 - 34.

Eigel, L., Koop, H-U., 1989, Nurse culture of individual cells: regeneration of colonies from single protoplasts of *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus* and *Hordeum vulgare*. J. Plant Physiol., 134, p. 577-581

Engler, D.E., Grogan, R.G., 1983, Isolation, culture and regeneration of lettuce leaf mesophyll protoplasts. Plant. Sci. Lett., 28, p. 223 - 229.

Evans, D.A., Bravo, J.E. 1983. Protoplast isolation and culture. In: *Handbook of Plant Cell Culture*. (ed. Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y.), vol. 1, MacMillan, New York, p. 124-177.

Ferreira, D.I., Zelcer, A., 1989, Advances in protoplast research on *Solanum*. Int. Rev. Cytology, 115, p. 1 - 65.

Fischer, C., Klethi, P., Hahne, G., 1992, Protoplasts from cotyledon and hypocotyl of sunflower (*Helianthus annuus L.*): shoot regeneration and seed production. Plant Cell Rep., 11, p. 632-636.

Fischer, C., Laparra, H., Charriere, F., Jung, J.-L., Hahne, G., 1996, Regeneration of Plants from Protoplasts of *Helianthus annuus* L.(Sunflower). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 38. *Plant Protoplasts and Genetic Engineering VII* (ed. Bajaj, Y.P.S.), Springer Verlag Berlin Heidelberg, p. 48-63.

Frearson, E.M., Power, J.B., Cocking, E.C., 1973, The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. Dev. Biol., 33, p. 130-137.

Furner, I.J., King, J., Gamborg, O.L., 1978, Plant regeneration from protoplasts isolated from a predominantly haploid suspension culture of *Datura innoxia* Mill. Plant Sci. Lett., 11, p. 169-176.

Galston, A.W., Kaur-Sawhney, R., Altman, A., Flores, H., 1980, Polyamines, macromolecular synthesis and the problem of cereal protoplast regeneration. In : *Advances in Protoplast Research*. (ed. Ferenczy, L., Farkas, G.L.). Pergamon. Oxford, p. 485-497.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res., 50, p. 151 - 158.

Gamborg, O.L., Davis, B.P., Stahlhut, R.W., 1983, Cell division and differentiation in protoplasts from cell cultures of *Glycine* species and leaf tissue of soybean. Plant Cell Rep., 2, p. 213- 215.

Glimelius, K., 1984, High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some *Brassicaceae*. Physiol. Plant., 61, p. 38-45.

Glimelius, K., Ottoson, A., 1983, Improved culture ability of the genus *Brassica* by using hypocotyls as the source for protoplasts. In : *Protoplasts 1983*. Proc. 6th Intl. Protoplast Sympos. Experientia Suppl., 46, p. 64 - 65.

Haicour, R., Sihachakr, D., 1995, Protoplastes, fusion somatique et metabolisme secondaire. In: *Biotechnologies Vegetales*. (Ed. Demarly Y., Picard E.) UNISAT, CNED, AUPELF-UREF, BV94.

Halim, H., Pearce, R.S., 1980, An electrophoresis method for bulk manipulation of isolated protoplasts from higher plants. Biochem. Physiol., Pflanz. (BPP), 175, p. 123-129.

Hall, J.L., Flowers, T.J., Roberts, R.M., 1974, *Plant Cell Structure and Metabolism*, Longman Ltd., London.

Hanstein, J. von., 1880, Einige Zuge aus der Biologie des Protoplasmas. Bot. Abhandl. Morphol. Physiol. (Bonn),4(2), p. 1-56.

Hayashi, M., Nakajima, T., 1984, Genetic stability in regenerated plants derived from tobacco mesophyll protoplasts through three-step culture. Jap. J. Breed., 34, p. 409 - 415.

Herman, E.B., 1995, *Recent advances in plant tissue culture III. Regeneration and micropropagation: techniques, systems and media 1991-1995*. Agritech Consultants Inc., Shrub Oak.

Huhtien, O., Honkanen, J., Simola, L.K., 1982, Ornithine – and putresceine-supported divisions and cell colony formation in leaf protoplasts of alders (*Alnus glutinosa* and *A.incana*). Plant Sci. Lett., 28, p. 3-9.

Ishii, S., 1989, Enzymes for the isolation of protoplasts. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. vol. 8. Plant Protoplasts and Genetic Engineering* I. (ed. Bajaj, Y.P.S. Y.P.S.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 23-32.

Jia, S.R., 1982, Factors affecting the division frequency of mesophyll protoplasts. Can. J. Bot., 60, p. 2192-2196.

Johnson, L.B., Stuteville, D.L., Higgins, R.K., Skinner, D.Z., 1981, Regeneration of alfalfa plants from protoplasts of selected Regen S clones. Plant Sci. Lett., 20, 297-304.

Johnson, L.B., Stuteville, D.L., Higgins, R.K., Douglas, H.L., 1982, Pectolyase Y-23 for isolating mesophyll protoplasts from several *Medicago* species. Plant. Sci. Lett., 26, p. 133-137.

Kania, R., Edwards, G.E., 1973, Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. Plant Physiol., 51, p. 1133-1137.

Kao, K.N., Michayluk, M.R., 1975, Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta, 126, p. 105-110.

Kao, K.N., Michayluk, M.R., 1980, Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. Z. Pflanzenphysiol., 96, p. 135-141.

Kao, K.N., Gamborg, O.L., Michayluk, M.R., Keller, W.A., Miller, R.A., 1973, The effects of sugars and inorganic salts on cell regeneration and sustained division in plant protoplasts.In: *Protoplastes et fusion de cellules somatiques vegetales*. Colloq. Int. Cent. Natl. Rech. Sci., 212, p. 207-213.

Karesch, H., Bilang, R., Potrykus, I., 1991, *Arabidopsis thaliana* : protocol for plant regeneration from protoplasts. Plant Cell Rep., 9, p. 575-578.

Karp, A., Nelson, R.S., Thomas, E., Bright, S.W.J., 1982, Chromosome variation in protoplast-derived potato plants. Theor. Appl. Genet., 63, p. 265-272.

Kaur-Sawhney, R., Flores, H.E., Galston, A.W., 1980, Polyamine-induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. Plant Physiol., 65, p. 368-371.

Kirby, E.G., Cheng, T.Y., 1979, Colony formation from protoplasts derived from *Douglas* fir cotyledons. Plant Sci. Lett., 14, p. 145-154.

Klercker, I., 1892, Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten. Ofvers Vet.-Acad. Forhdl., 9, p. 463-474.

Koop, H.-U., Weber, G., Schweiger, H.-G., 1983, Individual culture of selected single cells and protoplasts of higher plants in microdroplets of defined media. Z. Pflanzenphysiol., 112, p. 21-34.

Koop, H.-U., Schweiger, H.G., 1985, Regeneration of plants from individually cultivated protoplasts using an improved microculture system. J. Plant Physiol., 121, p. 245-257.

Krasnyanski, S., Menczel, L., 1993, Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus L.*). Plant Cell Rep., 12, p. 260-263.

Kumashiro, T., Asahi, T., Komari, T., 1988, A new source of cytoplasmic male sterile tobacco obtained by fusion between *Nicotiana tabacum* and X-irradiated *N. africana* protoplasts. Plant Sci., 55, p. 247-254.

Lang, H., Kohlenbach, H.W., 1989, Cell differenciation in protoplasts cultures from embryogenic callus of *Abies alba* L. Plant Cell Rep., 8, p. 120-123.

Lapara, H., 1996, Regeneration de plantes dans le genre *Helianthus* en vue de l'hybridation somatique interspecifique. These de Doctorat, Universite Louis Pasteur, Strasbourg.

Larkin, P.J., 1976, Purification and viability determenation of plant protoplasts. Planta, 128, p. 213-216.

Lesney, M.S., Callow, P.W., Sink, K.C., 1983, A simplified method for bulk production of cytoplasts from suspension culture derived protoplasts of *Solanum nigrum* L. In: Protoplasts 1983. Proc. 6th Intl. Protoplast Sympos., Experentia Suppl., 46, p. 116-117.

Lesney, M.S., Callow, P.W., Sink, K.C., 1986, A technique for bulk production of cytoplasts and miniprotoplasts from suspension culture-derived protoplasts. Plant Cell Rep., 5, p. 115.

Lorz, H., Harms, C.T., Potrykus, I., 1976, Isolation of "vacuoplast" from protoplasts of higher plants. Biochim. Physiol. Pflanzen., 169, p. 617-620.

Lorz, H., Paszkowschi, J., Dierks-Ventling, C., Potrykus, I., 1981, Isolation and characterization of cytoplasts and miniprotoplasts derived from protoplasts of cultured cells. Physiol. Plant., 53, p. 385-391.

Lowe, K.C., Davey, M.R., Power, J.B., 1995, Perfluorochemicals and plant biotechnology. In: *Fluorine in agriculture*. (ed. Banks R.E.), Rapra, Shrewsbury, p. 157-164.

Lozovaya, V.V., Plemenkova, S.F., Gorshkova, T.A., 1984, Transport of exogenous ^{14}C-glucose into isolated protoplasts and its utilization for structural polysaccharides synthesis. In: Proc. Intl. Sympos. "*Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement*". Czechoslovac Acad. Sci. Olomouc, p. 391-392.

Lu, D.Y., Pental, D., Cocking, E.C., 1982, Plant regeneration from seedling cotyledon protoplasts. Z. Pflanzenphysiol., 107, p. 59-63.

Lucas, G.B., Gooding, G.V., Sasser, J.N., Gerstel, D.U., 1980, Reaction of *Nicotiana africana* to black shank, granville wilt, root knot, tobacco mosaic virus and potato virus Y. Tobacco Sci., 141, p. 64-65.

Mackay, G.R., 1987, Selecting and breeding for better potato cultivars. In: *Improving Vegetatively Propagated Crops*. (ed. Abbott, A.J., Atkin R.K.). Academic Press, New York, p. 181-195.

Maheshwari, S.C., Gill, R., Maheshwari, N., Gharyal, P.K., 1986, Isolation and regeneration of protoplasts from higher plants. In: *Results and Problems in Cell Differentiation. 12. Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells* (ed. Reinert, J., Binding, H.). Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, p. 3-36.

Mathe, C., Rakosy-Tican, L., 1991, The influence of different osmotic stabilizers on wheat protoplast viability. In: *"In vitro" Explant Cultures -- Present and Perspective. The IVth National Symposium on Plant Cell and Tissue Culture*. (ed. Cachiță, C.D.), Cluj-Napoca, 1991, p. 97-99.

Menczel, L., Lazar, G., Maliga, P., 1978, Isolation of somatic hybrids by cloning *Nicotiana* heterokaryons in nurse cultures. Planta, 143, p. 29-32.

Menczel, L., Nagy, F., Kiss, Zs.R., Maliga, P., 1981, Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana* correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. Theor. Appl. Genet., 589, p. 191-195.

Merxmuller, H., Buttler, L.P., 1975, *Nicotiana* in der Afrikanischen Namib-Ein Pflanzengeographisches und Phylogenetisches Ratsel. Mitt. Bot. Munchen, 12, p. 91-104.

Meyer, Y., 1974, Isolation and culture of tobacco mesophyll protoplasts using a saline medium. Protoplasma, 81, p. 363-372.

Mollers, C., Wenzel, G., 1991, Somatic hybridization of dihaploid potato protoplasts as a tool for breeding tetraploid potatoes. Abstr. 8th Intl. Protoplast Sympos. Physiol.Plant., 82, A24.

Müller, B., Ryschka, U., 1987, Effect of various osmotic substances on protoplast isolation by enzymes. Biochem. Physiol. Pflanzen, 182, p. 183-186.

Muller, J.F., Missionier, C., Caboche, M., 1983, Low density growth of cells derived from *Nicotiana* and *Petunia* protoplasts : influence of the source of protoplasts and comparison of growth - promoting activity of various auxins. Physiol. Plant., 57, p. 35-41.

Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15, p. 473-497.

Nagata, T., Takebe, I., 1970, Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. Planta, 92, p. 301-308.

Nagata, T., Takebe, I. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta, 99: p. 12-20.

Nagy, J.I., Maliga, P., 1976, Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. Z. Pflanzenphysiol., 78, p. 453-455.

Negruțiu, I., Mousseau, J., 1980, Protoplast culture from *in vitro* grown plants of *Nicotiana sylvestris* Spegg. and Comes. Z. Pflanzenphysiol., 100, p. 373-376.

Nehls, R., 1978, Isolation and regeneration of protoplasts from *Solanum nigrum* L. Plant Sci. Lett., 12, p. 183-187.

Pilet, P.E., Prat, R., Roland, J.C., 1972, Morphology, RNase and transaminase of root protoplasts. Plant Cell Physiol., 13, p. 297-309.

Potrykus, I., Harms, C.T., Lorz, H., 1979, Multiple-drop-array (MDA) technique for the large scale testing of culture media variations in hanging microdrop cultures of single cell systems. I. The technique. Plant Sci. Lett., 14, p. 231-235.

Power, J.B., Davey, M.R., 1979, *Laboratory Manual*. Univ. Nottingham.

Power, J.B., Davey, M.R., 1990, Protoplasts of Higher and Lower Plants. Isolation, culture and fusion. In: *Methods in Molecular Biology, Vol. 6, Plant Cell and Tissue Culture* (ed. Polard J.W., Walker J.M.),The Humana Press, p. 237-259.

Puite, K.J., 1992, Progress in plant protoplast research. Physiol. Plant., 85, p. 403-410.

Rakosy-Tican, L., 1991, Plant protoplast immobilization -theoretical and practical aspects. In: *"In vitro" Explant Cultures, Present and Perspective*. În: *The IVth National Symposium on Plant Cell and Tissue Culture* (ed. Cachiță, C.D.), Cluj-Napoca, p. 28-29.

Rakosy-Tican, L., 1996, A new chemical method for plant protoplast fusion. In: *Current Problems and Techniques in Cellular and Molecular Biology*, Ed. Mirton, Timișoara, p. 697-704.

Rakosy-Tican, L., 1998 a, *Utilizarea tehnicilor de electrofuziune în hibridarea somatică a plantelor*. Presa Universitara Clujeană, Cluj Napoca.

Rakosy-Tican, L., (ed), 1998 b. *Plant Genetic Engineering* (Lab manual). *Inginerie genetică vegetală*. (Caiet de lucrări de laborator), Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca.

Rakosy-Tican, L., Dinu, L., 1994, Date recente în cercetările de inginerie genetică a cartofului (*Solanum tuberosum* L.). Lucrări ştiinţifice Anale ICPC Braşov, XXI, 11-30.

Rakosy-Tican, L., Menczel, L., 1998, Plant regeneration from cell-suspension-derived protoplasts of *Nicotiana africana* Merxm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 54, p. 93-95.

Rakosy-Tican, L., Soran, V., 1988, Protoplaştii vegetali şi rolul lor în cercetările de biologie celulară. Natura, XXXIX (2), p. 46-52.

Rakosy-Tican, L., Cachiţă C.D., Mathe, C., 1989, Procedeu chimic de fuziune a protoplaştilor vegetali. Brevet OSIM România, nr. 137792.

Rakosy-Tican, L., Jeannin, G., Hahne, G., 1998, *In vitro* morphogenesis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyl protoplasts – a comparative study for different cultivars. In: *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*. III. (ed. Crăciun, C., Ardelean, A.) Ed. Risoprint Cluj-Napoca, p. 492-496.

Rakosy-Tican, L., Anthony, P., Power, B.J., Davey, M.R., 1998, Magnesium sulphate can be used as osmoticum and fusion agent for plant protoplasts. Proc. IX Int. Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Plant Biotechnology and *In Vitro Biology in the 21st Century*. Jerusalem, Israel, June 14-19, (abstr), p. 170.

Rakosy-Tican, L., Hornok, M., Menczel, L., 2001, An improved procedure for protoplast microelectrofusion and culture of *Nicotiana tabacum* intraspecific somatic hybrids: plant regeneration and initial proofs on organelle segregation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67, p.153-158.

Raveh, D., Galun, E., 1975, Rapid regeneration of plants from tobacco protoplasts plated at low densities. Z. Pflanzenphysiol., 76, p. 76-79.

Saxena, P.K., 1985, Enhancement of protoplast regeneration by cold-conditioning of the donor tissue. J. Plant Physiol., 119, p. 385-389.

Saxena, P.K., Gill, R., Rashid, A., Maheshwari, S.C., 1982, Plantlets from mesophyll protoplasts of *Solanum xanthocarpum* . Plant Cell Rep., 1, p. 219-220.

Schlangstedt, M., Hermans, B., Zoglauer, K., Schieder, O., 1992, Culture of sugar beet protoplasts in alginate – Callus formation and root organogenesis. J. Plant Physiol., 140, p 339-344.

Schwenk, F.W., Pearson, C.A., Roth, M.R., 1981, Soybean mesophyll protoplasts. Plant Sci. Lett., 23, p. 153-155.

Shepard, J.F., 1980, Mutant selection and plant regeneration from potato mesophyll protoplasts. In : *Emergent techniques for the genetic improvement of crops.* (ed. Rubenstein, I., Gengenbach, B., Phillips, R.L., Green, C.E.) Univ. Minnesota Press., Minneapolis, p. 185-219.

Shepard, J.F., Totten, R.E., 1977, Mesophyll cell protoplasts of potato - isolation, prolifera tion and plant regeneration. Plant Physiol. (Bethesda), 60, p. 313-316.

Shepard, J.F., Bidney, D., Shahin, E., 1980, Potato protoplasts in crop improvement. Science, 208, p. 17-24.

Shillito, R.D., Paszkowski, J., Potrykus, I., 1983, Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. Plant Cell Rep., 2, p. 244-247.

Sidorov, V.A., Zubko, M.K., Kuchko, A.A., Komarnitsky I.K., Gleba Yu.Yu., 1987, Somatic hybridization in potato: use of gamma irradiated protoplasts of *Solanum pinnatisectum* in genetic reconstruction. Theor. Appl. Genet., 74, p. 364-368.

Sree Ramulu, K., Dijkhuis, P., Roest, S., 1983 a, Phenotipic variation and ploidy level of plants regenerated from protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje). Theor. Appl. Genet., 65, p. 329-338.

Steponkus, P.L., 1985, Cryologie of isolated protoplasts: Applications to plant cell preservation. In: *Cryopreservation of Plant Cell and Organs*. (ed. Kartha K.K.), CRC Press, Boca Raton, p. 49-60.

Swanson, E.B., Wong, R.S.C., Kemble, R.J., 1985, A novel method for the isolation and purification of protoplasts from friable, embryogenic corn (*Zea mays* L.) callus. Plant Sci., 40, p. 137-144.

Takeuchi, M., Matasushima, H., Sigawara, Y., 1980, Long-term freeze preservation of protoplasts of carrot and *Marchantia*. Cryo Lett., 1, p. 519.

Takeuchi, M., Matasushima, H., Sigawara, Y., 1982, Totipotency and viability of protoplasts after long-term freeze preservation. In: *Plant Tissue Culture 1982*. (ed. Fujiwara A.), Maruzen, Tokyo, p. 797-798.

Tarchevsky, J.A., Gorshkova, T.A., Salnikov, V.V., 1984, Role of photosynthesis in cell wall regeneration of isolated protoplasts. In: Proc. Intl. Sympos. " *Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement* ". Czechoslovac Acad. Sci. Olomouc, p. 395-396.

Tavazza, R., Ancora, G., 1986, Plant regeneration from mesophyll protoplasts in commercial potato cultivars (Primura, Kennebec, Spunta, Desiree). Plant Cell Rep., 5, p. 243-246.

Tavazza, R., Ordas, R.J., Ancora, G., 1988, Procedure for the regeneration of plants from cell suspension protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Desirée. Plant Sci., 58, p. 223-230.

Thorpe, T.A., (ed.) 1978, *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Univ. Calgary Press. Calgary.

Tricoli, D.M., Hein, M.B., Carnes, M.G. 1986. Culture of soybean mesophyll protoplasts in alginate beads. Plant Cell Rep., 5: p. 334-337.

Tricoli, T.A., Hein, M.B., Carnes, M.G., 1986, Culture of soybean mesophyll protoplasts in alginate beads. Plant Cell Rep., 5, p. 334-337.

Uchimiya, H., Murashige, T., 1976, Influence of the nutrient medium on the recovery of dividing cells from tobacco protoplasts. Plant Physiol. (Bethesda), 57, p. 424-429.

Vasil, V., Vasil, I.K., 1979, Isolation and culture of cereal protoplasts. I. Callus formation from pearl millet (*Pennisetum americanum*) protoplasts. Z. Pflanzenphysiol., 92, p. 379-384.

Vasil, I.K., Vasil, V., 1980, Isolation and Culture of Protoplasts. Int. Rev. Cytol., Suppl. 11 B, p. 1-19.

Waara, S., 1991, Production and characterization of intraspecific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum* L.). PhD Thesis. Uppsala University, Uppsala Sweden.

Wallin, A., Eriksson, T., 1973, Protoplast culture from cell suspensions of *Daucus carota*. Physiol. Plant., 28, p. 33-39.

Wenzel, G., 1980, Protoplast techniques incorporated into applied breeding programs. In : *Advances in protoplast research*. Proc. 5th Intl. Protoplast Sympos., Akad. Kiado Budapest, p. 327-339.

Wichers, H.J., Ten Kate, J., Buys, C.H.C.M., Huizing, H.J., 1984, A simple and rapid procedure to obtain nucleated protoplasts from plant material. Cytologia, 49, p. 529-535.

Widholm, J.M., 1972, The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Technol., 47, p. 189-194.

Williamson, F.A., Fowke, L.C., Weber, G., Constabel, F., Gamborg, O.L., 1977, Microfibril deposition on cultured protoplasts of *Vicia hajastana*. Protoplasma, 91, p. 213-219.

Xu, Z.-H., Davey, M.R., Cocking, E.C. 1981. Isolation and sustained division of *Phaseolus aureus* (mung bean) root protoplasts. Z. Pflanzenphysiol., 104: p. 289 - 298.

Xuan, L.T., Menczel, L., 1980, Improved protoplast culture and plant regeneration from protoplast-derived callus in *Arabidopsis thaliana*. Z. Pflanzenphysiol., 96, p. 77-80.

Zapata, F.Y., Sink, K.C., Cocking, E.C., 1981, Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three *Lycopersicon* species: *L. esculentum* cv. Walter, *L. pimpinillifolium* and *L. hirsutum f. glabratum*. Plant Sci. Lett., 23, p. 41-46.

Zieg, R.G., Outka, D.E., 1980, The isolation, culture and callus formation of soybean pod protoplasts. Plant Sci. Lett., 18, p. 105-114.

Zuba, M., Binding, H., 1989, Isolation and culture of potato protoplasts. In : *Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 8. Plant Protoplasts and Genetic Engineering. I.* (ed. Bajaj, Y.P.S.) Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, p. 124-146.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

GLOSAR DE TERMENI UTILIZAȚI ÎN BIOTEHNOLOGIE

Acid abscisic - fitohormon cu rol inhibitor asupra unor procese de creștere, implicat fiind în instalarea și menținerea latenței și a senescenței.
Acid dezoxiribonucleic (AND) - acid organic complex, constituent esențial al cromozomilor, suportul molecular al informației genetice care codifică sinteza tuturor proteinelor din organism.
Adventiv - mod de generare a unui organ sau a unui embrion, altfel decât în mod obișnuit, din primordii, respectiv din zigot, proces care este răspunzător de organogeneza adventivă în înmulțirea vegetativă, de exemplu, în butășire formarea de rădăcini pe tulpină sau pe frunze.
Agar-agar - polizaharid extras din alge, utilizat pentru solidificarea mediilor de cultură (medii agarizate).
Agregat celular -conglomerat de celule, aderente unele de altele, de forme și mărimi variate, care chiar și prin agitare se disociază greu.
Androgeneză - dezvoltarea unui individ *haploid*, respectiv a unui embrion, din microspori sau din celule ale *gametofitului mascul.*
Aneuploid - celule, țesuturi și organisme care au mai puțini sau mai mulți cromozomi decât un multiplu exact al numărului de cromozomi din celula haploidă.
Anergism - vezi *habituație*.
Apex, apical - extremitatea unui organ; meristeme apicale = meristeme terminale.
Apogamie - dezvoltarea unui embrion din celule ale sacului embrionar, nu din oosferă; celula inițială poate fi haploidă (sinergide sau antipode) sau diploidă. Apogamia este un caz pariticular de *apomixie*.
Apomixie - reproducere asexuata prin care se formează embrioni din celulele diploide ale diferitelor componente ale ovulului.
Aseptic (steril sau axenic) - liber de microorganisme (bacterii, ciuperci, virusuri, micoplasme).
Autoclavă - aparat utilizat pentru sterilizare, ce funcționează cu aburi aflați sub presiune.
Auxine - compuși organici, *naturali* (*fitohormoni*: AIA) sau de *sinteză*, care induc procese de creștere și de morfogeneză, cum sunt: diviziunea celulelor (alături de citochinine), creșterea în lungime a acestora, rizogeneza secundară și cea adventivă, dominanța apicală ș.a.
Axenic (steril) - liber de infecții.
Axilar - situat la axila frunzelor, de exemplu mugurii axilari.
Bancă de gene - colecție de: viețuitoare, organe sau de molecule.

Bază azotată - moleculă organică ce intră în alcătuirea nucleotidelor, fiind elementele de structură ale acizilor nucleici.
Bioconversie - transformarea energiei, sau sinteza de substanţe organice prin mijlocirea sistemelor vii, utilizându-se precursori existenţi în mediu.
Biodiversitate - diversitatea florei şi faunei din mediul natural.
Bombardament cu particule - metodă de transfer a genelor prin accelerarea – pe cale fizică – a microparticulelor învelite în AND, prin care se penetrează ţesuturile şi celulele intacte.
Cadru de citire - ordonarea nucleotidelor în codoni.
Caliclone - plante generate din *calus*.
Calus - ţesut care, în mod natural, se formează la nivelul suprafeţelor vătămate ale unui organ sau organism. În tehnica culturilor de ţesuturi vegetale, prin calus se înţelege o multiplicare haotică a celulelor în urma căreia rezultă o aglomerare de celule, care manifestă o creştere neorganizată, ce nu se supune mecanismelor de endoreglare şi de integrare ale organismului. Calusul poate fi cultivat indefinit, prin efectuarea – în timp util – de repicări repetate periodic. La nivelul calusului, în anumite condiţii, se pot regenera organe sau embrioni somatici.
Calusogeneză - generare de *calus*.
Cambiu - meristem – în sens strict – meristem secundar; zonă generatoare libero-lemnoasă.
Cameră de cultură - camera în care sunt menţinute culturile *in vitro*, în condiţii controlate de lumină şi de temperatură.
Cariograma - reprezentarea grafică a cromozomilor unui cariotip. Ea se alcătuieşte pe baza unor măsurători efectuate la nivelul cromozomilor (lungimea totală a cromozomului, lungimea braţelor şi raportul dintre acestea, indicele şi poziţia centromerului, poziţia strangulaţiilor secundare, a organizatorului nucleolar, a regiunilor heterocromatice etc.).
Cariotip - caracteristicile cromozomilor vizibile la microscop (număr, formă, mărime şi alte aspecte morfologice), la celulele aflate în metafază.
Caseta de expresie - construcţie plasmidială care conţine componentele necesare exprimării genelor în plante (promotorul, secvenţa de poliadenilare şi un polilinker - numit şi *situs* de expresie multiplă - pentru inserarea în celule a genelor de interes).
Caulogeneză - procesul de diferenţiere a mugurilor şi dezvoltarea *tulpinii*.
Celulă hibridă - celula rezultată în urma fuzionării a două sau mai multe celule, din acestea formându-se un *sincarion*.
Chinetină - fitohormon, compus de natură organică - natural sau de sinteză – care induce şi susţine formarea mugurilor adventivi, caulogeneza, previne

senescenţa, iar alături de auxine concură la realizarea mitozei.
Cibrid - hibrid citoplasmatic, celulă viabilă care se formează prin fuziunea unui citoplast (citoplasmă lipsită de nucleu) cu un protoplast, sau a unui protoplast iradiat (numit donor), cu un protoplast neiradiat (numit receptor).
Ciclu celular - totalitatea proceselor morfofiziologice şi biochimice care se desfăşoară într-o celulă, de la o diviziune la alta.
Citochinine - compuşi *naturali*, sau de *sinteză*, care au în structura lor *adenină*; ele induc şi susţin procesele de caulogeneză, preîntâmpină senescenţa, suprimă efectul de dominanţă apicală instalat de auxină ş.a. Reprezentanţi naturali, vegetali: chinetina (K sau Kin) şi zeatina (Z).
Clonă - celule, ţesuturi sau plante identice din punct de vedere genetic, descendente prin mitoză, fără fecundaţie, prin înmulţire vegetativă, operaţiune numită clonare.
Clonarea unei gene - izolarea şi multiplicarea unei gene, în general, în plasmidele bacteriene.
Clonă moleculară - izolarea şi amplificarea fragmentelor de AND, în clone celulare.
Cod genetic - sistemul de codificare al informaţiei genetice, constituit din 64 de triplete (codoni), care stabileşte corespondenţa dintre succesiunea bazelor din ADN şi succesiunea amino acizilor din proteine.
Codon şi anticodon - secvenţă specifică de trei nucleotide din ARNm (codon) şi secvenţa complementară de trei nucleotide din ARNt (*anticodon*); nucleotidele stochează şi transferă informaţia genetică, care determină împerecherea bazelor între codoni şi anticodoni specifici, stabilind astfel ordinea în care amino acizii sunt incluşi în catenele polipeptidice.
Colonie - agregat de celule înconjurate de o membrană sau care alcătuiesc o masa comună.
Contig - serie continuă de secvenţe de ADN clonate şi suprapuse.
Cosmidă - vector apt să cloneze în bacterii inserţii de ADN care măsoară 20-40 kilobaze (kb).
Cormofitoinocul - fragment (explant) prelevat de la plante superioare (cormofite) introdus şi cultivat în vitrocultură.
Creştere - mărirea cantitativă şi ireversibilă a numărului de elemente care alcătuiesc un sistem, sau un organism viu. Procesul de creştere este o condiţie a dezvoltării; în desfăşurarea creşterii au loc o mulţime de transformări structurale şi modificări calitative şi cantitative.
Cultivar - soi sau varietate cultivată, obţinută artificial prin tehnici de ameliorare, ce prezintă caractere distincte care se menţin atât pe calea reproducerii sexuate, cât şi a celei asexuate.

Cultură - în tehnicile de vitrocultură, noțiunea semnifică totatitatea metodelor utilizate în scopul înmulțirii și creșterii organismelor, organelor, țesuturilor și a celulelor, pe un mediu artificial. După tipul și proveniența materialului vegetal se pot distinge mai multe tipuri de culturi aseptice: **cultura de embrioni zigotici** (maturi sau nematuri), de **plantule**, de **organe, cultura de țesuturi** (și de **calus**), de **protocormi, propaguli, minibutași, cultura de celule** sau de suspensii celulare și **cultura de protoplaști (protoplaste).**
Cultură de celule - cultivarea *in vitro* a celulelor solitare sau a agregatelor celulare, în suspensie sau ca celule imobilizate pe suporturi inerte.
Cultură de embrioni - cultivarea *in vitro* a embrionilor, pe medii nutritive, artificiale.
Cultură de organe - cultura *in vitro* de organe izolate, în regim care să permită dezvoltarea sau conservarea lor.
Cultură de molecule (molecular farming) - producerea de molecule sau de vaccinuri cu efecte terapeutice, de către plante transgenice.
Cultură primară - (cultură de ordinul întâi) - cultură de celule, țesuturi sau de organe obținută prin prelevarea directă a materialului viu dintr-un organism.
Dediferențiere - anularea procesului de diferențiere și revenirea celulelor la starea embrionară, meristematică. Celulele dediferențiate pot să se înmulțească (să prolifereze) și să genereze un țesut nediferențiat în care, ulterior, poate să se petreacă o diferențiere. Dediferențierea "in situ" apare mai rar, dar "in vitro" aceasta este un fenomen obișnuit.
Dediferențiere celulară - autotransformarea celulelor diferențiate în nediferențiate, respectiv în *meristeme*.
Densitate celulară - numărul de celule/unitate de volum.
Detergent - compus organic care scade tensiunea superficială a unei soluții, servind la facilitarea contactului dintre un agent sterilizant și suprafața unui corp.
Dezinfectare - omorârea microorganismelor.
Dezvoltare - la plante, semnifică parcurgerea unui ciclu de la sămânță la sămânță, sau a unui organ de la formarea sa și până la senescență, ori schimbarea formei plantei prin creștere și diferențiere, altfel spus, totalitatea modificărilor *cantitative* și *calitative* pe care le suferă un organism din momentul conceperii sale și până la maturitate deplină.
Diferențiere - pierderea progresivă a caracterelor morfologice și citofiziologice caracteristice celulei embrionare și dobândirea acelora specifice unei celule adulte, ce deține o anumită specializare funcțională. Diferențierea se manifestă la nivel *molecular* (diferențiere biochimică, cu dobândirea unor

noi capacităţi de biosinteză), *ultrastructural* – de organit sau de celulă – şi *tisular* (cu formarea de ţesuturi de protecţie, de conducere, mecanice, parenchimuri variate etc.) conducând la formarea ţesuturilor şi a *organelor* unui organism. Celulele diferenţiate îşi pierd capacitatea de a se divide, pot prezenta structuri particulare, în general, prezintă vacuole mari, iar raportul nucleo-plasmic este scăzut.

Dihaploid - organism cu 2n = 2x cromozomi, care se formează dintr-un tetraploid 2n = 4x.

Diploid - individ care prezintă în nucleii celulelor sale dublul numărului de bază de cromozomi (x); formula genomică: 2n = 2x.

Electroforeză - metodă de separare a unor compuşi în funcţie de lungimea moleculelor (greutatea moleculară) şi de sarcina electrică.

Embriogeneză - proces de formare a unui embrion pe cale *sexuată*, din zigot, sau pe cale *asexuată*, din una sau din câteva celule somatice.

Embrioid - embrion nezigotic, generat în vitrocultură. Structura sa este analoagă cu aceea a embrionului zigotic. Embrioizii pot deriva din celule *diploide* ("embrioni somatici") sau din celule *haploide* (din polen = embrioni *androgenetici*, sau din celulele haploide ale sacului embrionar al ovulului = embrioni *ginogenetici*). El are caracteristic o structură bipolară, deţinând un pol corespunzător muguraşului şi un altul opus acestuia, respectiv rădăcinița.

Embrion - organism tânăr aflat în primele stadii ale dezvoltării sale, la spermatofite, de exemplu, el reprezintă plantula din sămânţă.

Embrion avortat - embrion mort.

Embrion somatic - embrion rezultat în urma diviziunii repetate a celulelor somatice, celule care se organizează morfostructural după tipicul embrionului zigotic.

Endocicluri - cicluri succesive de replicate a cromozomilor în interiorul învelişului nucleului.

Endomitoză - multiplicarea cromozomilor în lipsa separării grupelor anafazice, fără scindarea citoplasmei (cariocineză), în absenţa formării fusului de diviziune şi a peretelui celular.

Endopoliploidie - poliploidie rezultată din dublări repetate ale numărului de cromozomi prin endocicluri de replicare, fără ca să se producă o diviziune celulară mitotică, normală. Gradul de ploidie corespunde cu numărul de endomitoze care au avut loc.

Enzimă - proteină care catalizează o reacţie chimica desfăşurată într-un sistem biologic sau în afara acestuia.

Enzima de restricţie - enzimă care fragmentează molecula de AND în sec-

vențe specifice de nucleotide, pe care aceasta le recunoaşte.
Eucariot - organism alcătuit din una sau mai multe celule, care au informația genetică inclusă în nucleu.
Excizie - secționarea unei porțiuni de țesut sau de organ, urmată de scoaterea acestuia din organism.
Explant - fragment dintr-un organism (apex, organ, fragment de organ) detaşat de la locul lui de origine; inoculat şi cultivat pe medii artificiale, el constituie piesa cu care se va iniția o vitrocultură; operațiunea de deprindere a explantului se numeşte *explantare*.
Friabilitate - tendința de separare; în vitrocultură, tendința celulelor de a se separa unele de altele, mai ales în cazul calusului.
Fungicid - substanță antifungică care omoară o ciupercă.
Genă - secvență din molecula de ADN (sau de ARN la ribovirusuri) care conține informația genetică necesară pentru sinteza unei catene polipeptidice.
Genă marker - genă clonată, utilizată pentru identificarea celulelor transformate; transferată în celule, aceasta poate conferi toleranță, de exemplu, la antibiotice ori la erbicide specifice.
Genă raportor - genă ce codifică produşi care pot fi cuantificați prin teste biochimice
Genom - totalitatea genelor unui organism, prezente în toate celulele acestuia.
Giberelinele - fitohormoni (*naturali* sau de *sinteză*) implicați în procesele de creştere în lungime, mai ales a internodiilor (reprezentant: acidul giberelic, abreviat: AG_3 sau GA_3, de la"gibberellic acid" din limba engleză).
Ginogeneză - dezvoltarea unei plante *haploide* din celule ale gametofitului femel.
Habituație - capacitatea celulelor de a creşte în absența unor fitohormoni (sau regulatori de creştere), ori a unor vitamine, după o vitrocultură - mai mult sau mai puțin îndelungată - în prezența unor astfel de substanțe.
Haploid - indivizi (haploizi), celule, țesuturi sau organisme care posedă un singur set de cromozomi. caracteristic celulelor germinale, mature. Numărul de cromozomi tipic al unui gamet, după meioză, se notează cu "n". La celulele eucariote, stadiul haploid este numai o etapă temporară în cadrul ciclului ontogenetic.
Heterocarion - celulă în care există doi sau mai mulți nuclei diferiți, ca rezultat al fuziunii celulare.

Hibrid - un organism animal sau vegetal rezultat din încrucişarea a doi taxoni diferiţi (specii, subspecii, rase, soiuri). Oul rezultat prin hibridare se numeşte hibrid sau *heterozigot*.
Hibrid somatic - hibrid (celulă mononucleată) rezultat din contopirea celulelor somatice derivate din părinţi diferiţi din punct de vedere genetic.
Hibridarea acizilor nucleici - tehnică care utilizează recunoaşterea specifică, de către o sondă de ADN marcată, a unei secvenţe complementare în acidul nucleic ţintă.
Homocarion - celulă în care, în urma unei fuziuni celulare, sunt prezenţi doi sau mai mulţi nuclei identici.
Hormon vegetal (fitohormon) - substanţă organică produsă de plante, sau sintetizată chimic, care – în cantităţi mici – induce, inhibă sau modifică cantitativ creşterea, anteza, coacerea, abscizia foliară ş.a., prezentă fiind, frecvent, în altă parte a plantei decât la locul ei de origine.
Implantul - fragment excizat dintr-un organism şi introdus, ori grefat, într-un alt organism sau ţesut.
Implantare - operaţiune prin care un corp, respectiv o celulă, organit celular sau un fragment de ţesut, este inserat ori grefat în interiorul unui organism; în vitrocultură, prin implantare se poate subînţelege şi amplasarea explantelor (de exemplu a minibutaşilor) în mediul de cultură solidificat.
Incubare - în cazul culturilor de celule şi ţesuturi, incubarea este răstimpul scurs de la inoculare şi până la sfârşitul perioadei de creştere a lor "in vitro".
Incizie - tăietură (crestătură) practicată pe marginea unui organ, sau la periferia unui ţesut ori ţesuturi, cu ajutorul unui instrument tăios.
Inducere - provocarea unui proces care are ca rezultat producerea unui fenomen scontat, previzionat.
Inducerea haploidiei - stimularea *in vitro* a regenerării autonome de celule, embrioni, plantule, din gameţi masculi sau femeli.
Inginerie genetică - ansamblu de tehnici practicate *in vitro*, prin care se urmăreşte modificarea patrimoniului ereditar al unei celule, prin manipulare de gene.
Inocul - explant sau celule introduse într-un mediu de cultură, pregătit în acest scop
Inoculare - operaţiunea de amplasare a unui corp – organism, fragment de organism, calus, celule, sau porţiune dintr-o vitrocultură- în sau pe un mediu nutritiv.
Interval de subcultură - intervalul de timp scurs între două repicări ale unei subculturi.
„In vitro" - (literar semnifică "în sticlă") termen ce se utilizează pentru de-

semnarea oricăror procese care se petrec în condiții sterile de cultură, folosind recipiente din sticlă sau din material plastic.

"In vivo" - (literar semnifică "în viață"), noțiune care se utilizează pentru definirea oricăror procese ce se petrec în organismul întreg, respectiv integru.

Lăstar - ramură tânără sau tulpiniță care crește la nivelul unui inocul (calus, nod, fragment de pețiol etc.), din muguri normali sau adventivi.

Linie celulară - cultură derivată dintr-o unică celulă. O "linie celulară" se obține prin izolarea unei singure celule care formează apoi o cultură primară. Din aceasta, ulterior, se pot preleva explante pentru înființarea unei culturi care va aparține aceleiași linii; altfel spus, populație (de celule sau de indivizi) descendentă dintr-o celulă, prin mitoze succesive.

Linie clonată - o linie descendentă dintr-o clonă.

Mediu de bază - compușii anorganici și organici de bază, sau mediu lipsit de regulatori de creștere.

Mericlonă - plante, *clone*, regenerate dintr-un meristem care a stat la baza inițierii vitroculturii.

Meristem – masiv de celule permanent tinere, care au caracteristic faptul că, pe toată durata vieții lor ele proliferează; din celulele rezultate din activitatea meristemului, ulterior, rezultă toate categoriile de țesuturi.

Meristematic - celule având caracter de meristem.

Meristemoid - grup de celule meristematice cu potențială transformare în meristem radicular sau caulinar; astfel de cazuri apar fie la nivelul calusului, fie sunt localizate în alte zone decât în cele în care sunt amplasate meristemele.

Micropropagare - procedură prin care se realizează propagarea pe cale asexuată, sau vegetativă, a plantelor "in vitro" (termen sinonim cu propagarea *in vitro* sau cu microînmulțirea).

Microexplant - explant de dimensiuni microscopice.

Micromultiplicare - procedură de înmulțire *in vitro*, prin utilizarea de inoculi de mici dimensiuni termen (sinonim cu microînmulțirea).

Monoploid - indivizi, țesuturi ori celule care au un singur set de cromozomi, în număr egal cu acela care constituie baza unei serii poliploide; se notează cu *X*. Monoploidul este un veritabil haploid.

Monostrat - strat unic (monomolecular sau monocelular), omogen, de unități: molecule, celule etc. În cazul culturilor de celule, pelicula de la suprafața mediului de cultură formată dintr-un unic strat de celule.

Morfogeneză - (dezvoltarea formei) - procese morfoanatomice și structurale asociate unor fenomene de diferențiere, ori diferențierea histologică, com-

plexă, care are ca rezultat constituirea unor organe. Altfel spus, este procesul de creştere şi dezvoltare a structurilor diferenţiate, sau dezvoltarea organismului, ori a unei părţi din organism sau a unui organ, dintr-un zigot ori dintr-o celulă iniţială; morfogeneza se petrece în timp, este înscrisă în programul genetic al celulelor şi în decursul desfăşurării acesteia ea se confruntă, permanent, cu condiţiile de mediu.

Multiplicare - procesul de înmulţire a celulelor; multiplicarea poate semnifica şi reproducerea indivizilor, implicând înmulţirea sexuată şi asexuată.

Multiplicare vegetativă - termen sinonim cu reproducerea sau înmulţirea asexuată.

Mutaţie - schimbarea eredităţii la nivel genetic.

Neoformaţie - formarea de structuri noi, respectiv de ţesuturi, meristeme, embrioizi etc. Neoformaţiunile se constituie după dediferenţiere.

Nucleotidă - subunitate a acizilor nucleici alcătuită dintr-un glucid, un fosfat şi o bază azotată.

Organogeneză - formarea de organe (rădăcini, tulpini, frunze etc.).

Parasexualitate - fenomene care fac tranziţia între reproducerea sexuată şi înmulţirea vegetativă. În această categorie intră: *apogamia*, *apomixia*, *partenogeneza*, *pseudomixia*.

Pasaj - transferarea celulelor, cu sau fără diluarea acestora, dintr-un vas de cultură în altul. Termenul este sinonim cu cel de "subcultură".

Plantă haploidă - plantă cu număr gametic de cromozomi (notat cu "*n*").

Plantulă (în engleză "plantlet") - în vitrocultură, tulpiniţă generată şi înrădăcinată "in vitro", ori embrionul germinat.

Plasmalemă - biomembrana care delimitează citoplasma la exterior, la nivelul contactului acesteia cu peretele celular pectocelulozic.

Plasmidă - moleculă mică, circulară, de ADN extracromozomal, prezentă frecvent la bacterii, capabilă să se replice autonom, în celula de origine sau într-o alta celulă gazdă.

Poliploid - celulă sau organism conţinând într-un nucleu trei (triploid), patru (tetraploid) sau mai multe seturi de cromozomi.

Precursor - substanţa care precede formarea unui compus; amino acizii sunt precursorii proteinelor, bazele azotate sunt precursorii acizilor nucleici ş.a.

Prelevat - a lua un anumit fragment (relativ mic) dintr-un întreg sau dintr-o cantitate mai mare.

Primordiu - grup de celule care reprezintă primul stadiu de dezvoltare al unui organ.

Proliferare celulară - înmulţirea celulelor.

Proembrion - structură embrionară care precede formarea embrionului sau

faza inițială de diferențiere a celulelor, într-o formațiune similară embrionului.

Progenitură - orice individ care continuă o linie genetică, indiferent de modul de înmulțire (descendent, vlăstar, urmaș, pui).

Promeristem - meristem tânăr, fie el de tip caulinar, fie de tip radicular, cu structură încă nediferențiată fiziologic.

Propagul - în sens larg, structuri folosite în înmulțirea vegetativă.

Protocorm - entitate morfoanatomică prezentă la orhidee, semințele lor, după germinare, generează o mică formațiune tuberiformă, de culoare verde, din care ia naștere o plantă complet conformată. *În vitro* – la numeroase orhidee – din explante meristematice se formează protocormi, care fie pot genera o plantă, fie se pot multiplica, generând alți protocormi, asociați în glomerule.

Protoplast - celulă denudată, eliberată de peretele pectocelulozic sau, altfel spus, întreaga masă celulară, vie, delimitată la exterior de plasmalemă.

Repicarea - procedeu prin care un explant (sau o porțiune dintr-o vitrocultură) este transplantat (cultivat), într-un alt mediu de cultură.

Replicare - în biologia și genetica moleculară prin replicare se înțelege dublarea unei molecule (AND în speță) sau a unui agregat de molecule, prin copierea formei unei molecule preexistente, sau a unei structuri de același tip (de exemplu replicarea chinetosomilor, mitocondriilor, cloroplastelor etc.).

Reproducere - generare de noi indivizi. Există mai multe moduri de reproducere: *sexuată* (cu participarea gameților masculi și femeli) și cea *asexuată*, prin diviziune mitotică, înmugurire, formare de spori, partenogeneză, înmulțire vegetativă etc.

Rizogeneză - procesul de diferențiere și de dezvoltare a rădăciniilor.

Stereomicroscop -microscop binocular care mărește de 5 - 20 de ori.

Sterilizare (sinonim cu aspsizarea) – procedeu de eliminare a microorganismelor.

Subcultură (vezi pasaj) - în vitrocultură procesul semnifică cultura în care inoculul, sau fragmente din acesta, este amplasat pe un mediu de cultură proaspăt, în regim aseptic.

Timp de dublare a populației - intervalul de timp în care o populație de organisme pluricelulare sau monocelulare își dublează numărul de indivizi. De exemplu, intervalele în care numărul de indivizi crește de la $1x10^6$ la $2x10^6$, apoi la $4x10^6$, la $8x10^6$ ș.a.m.d.

Timp de generă celulară - intervalul de timp dintre două diviziuni succesive ale unei celule; el constituie, în fapt, durata unui ciclu celular complet.

Tumoră - țesut care se dezvoltă într-un organism prin înmulțirea continuă, anormală, a celulelor. Tumorile pot să apară în urma unei infecții (virale sau bacteriene) sau a tulburării echilibrului hormonal, ori pot să aibă o cauză genetică.
Totipotență - la cormofite, capacitatea celulelor de a regenera plante.
Transfer de gene sau transgeneza - introducerea în genomul unei celule a unei/unor gene ce provine/provin de la o alt(e) organism(e) sau de la același organism.
Transformare genetică - modificarea genomului unui organism prin inginerie genetică.
Transplant - sistem viu care este supus operației de transplantare.
Transplantare - operațiunea prin care o celulă, un țesut sau un organ luat dintr-un corp este grefat în altă parte a corpului, pe un alt organism sau pe un mediu de cultură.
Transgenă - procedura de introducere a unei gene în genomul unui organism, prin inginerie genetică.
Variație epigenetică - variație neereditară, frecvent reversibilă, consecință a modificării expresiei genelor.
Variația somaclonală - variația manifestă la nivelul vitroplantule regenerate în regim aseptic.
Vitroplantulă - plantulă generată și crescută *in vitro*.
Vitrocultură - cultură practicată în condiții artificiale, în vase din sticlă sau din material plastic, în general în regim aseptic, având o nutriție fie *heterotrofă* – inoculi care cresc exclusiv pe baza compușilor organici din mediul de cultură, fie *mixotrofă* – cormofitoinoculi care utilizează, în mare parte, ca sursă energetică, glucidele din mediu, dar care și fotosintetizează, grație clorofilei prezente în cloroplastele din celulele sau țesuturile verzi, fie *fotoautotrofă* – cormofitoinoculi care trăiesc în regim de vitrocultură, în lipsa glucidelor din mediile de cultură, proces care se realizează la nivelul inoculilor ce dețin cloroplaste, într-o atmosferă îmbogățită în CO_2 și într-un regim intensificat de iluminare.
Zigot - celulă care se formează în urma contopirii a doi gameți; altfel spus, oosfera fecundată.

Cota veche | Prețul 10 RON
10 RO

Tiparul executat prin comanda nr. 604, 2004, la

CARTPRINT Baia Mare, cod 430061
cartier Săsar, str. Victoriei nr. 146
tel./fax: 0262/218923
ROMÂNIA

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

"Tratatul de biotehnologie vegetală" se adresează specialiștilor din domeniul culturilor de țesuturi și de celule vegetale, celor care doresc să se documenteze referitor la ultimele cuceriri științifice dobândite în această nouă ramură a biologie, respectiv aceea a *biotehnologiei vegetale*, precum și *doctoranzilor, masteranzilor* sau *studenților* din profilele teoretice și aplicative ale fitobiologiei. Tratatul este conceput în mai multe volume, primul volum axându-se pe aspectele generale, de ordin fundamental și practic, care au condus la apariția acestui nou domeniu de activitate.

Autorii

DACIA
www.edituradacia.ro
ISBN 973-35-1798-4

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY